Eny Maria Goloni Bertollo

Estudo Citogenético e Genético-Clínico em Neurofibromatose

ENY MARIA GOLONI BERTOLLO

ESTUDO CITOGENÉTICO E GENÉTICO-CLÍNICO EM NEUROFIBROMATOSE

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

662/94

Tese apresentada para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Intituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia

São José do Rio Preto

1994

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia

Dedico este trabalho

À meu marido, Jesus Bertollo

À meus pais, Pedro e Terezina

À meus irmãos, Elder, Elvis, Elmer e Esli

"Ninguém nasce forte, torna-se forte. É pela repetição de atos, por pequenas vitórias e sacrifícios reiterados, que se consegue um coração generoso e uma grande coragem".

P. de Ponlevoy

À Marileila Varella Garcia, a qual devo a felicidade de ter podido escrever estas linhas.

"É preciso crer no que se faz, e fazê-lo com entusiasmo".

Ollé-Laprune.

AGRADECIMENTOS

"Ao fim de cada prova desafiadora, temos a impressão de que uma estrela nova se levantou no céu dos nossos destinos, iluminando com seus raios luminosos o fundo da nossa consciência".

Alberto Montalvão

Muitas pessoas foram luzes durante o desenvolver desse trabalho, iluminando meu caminho e possibilitando direta ou indiretamente sua concretização.

À Profa. Dra. *Marileila Varella Garcia*, modelo de pesquisadora, pela orientação, apoio amigo constante e sabedoria, meu agradecimento especial, pois a ela devo a felicidade de ingressar na vida científica e poder caminhar e crescer rapidamente com sua orientação segura e eficaz.

Ao Prof. Dr. *Antonio Richieri Costa* e as Profas. Dras. *Joyce Anderson Duffles Andrade*, *Elaine S. de Oliveira Rodini* e *Ana Elizabete Silva*, pela atenção, carinho e por todas as valiosas sugestões durante a análise da pró-forma.

Ao Prof. *Antonio José Manzato*, do Depto. de Ciência da Computação e Estatística deste Instituto, pela presteza e valiosa assessoria estatística.

Ao *Jesus Antonio Bertollo*, companheiro e amigo, que sempre me incentivou e colaborou na realização deste trabalho, principalmente na digitação do texto.

Ao gerente do Polo Computacional da UNESP de S. J. Rio Preto, *José Maria de Almeida*, pela atenção, amizade e por colocar a disposição todos os recursos de informática de sua unidade.

Ao *Cristiano Nunes Pereira*, funcionário do Polo Computacional, responsável pela Rede Internacional de Computadores (INTERNET), por ter possibilitado o contato rápido e eficiente com minha orientadora nos EUA, pelo carinho, pela disponibilidade e dedicação na execução de serviços de edição final do texto.

Ao Prof. Dr. *James Coleman* e a tradutora e intérprete *Vera Lucia Buchalla*, da Traducom, pela revisão do Summary.

Ao *Nicola Vanderlei Viragine* pelo auxílio na confecção do banco de dados e geração de tabelas através do software de análise estatística.

Ao funcionário e amigo *Josué Rodrigues dos Santos*, pelo auxílio técnico-laboratorial e pelos serviços fotográficos realizados com eficiência e dedicação.

Ao Dr. *João Roberto Antonio* e a Dra. *Marta Ferrari Teixeira*, docentes da Fundação Faculdade Regional de Medicina de S. J. Rio Preto (FUNFARME), dos Deptos. de Dermatologia e Oftalmologia, pelo encaminhamento de alguns pacientes e pela discussão clínica dos casos.

Ao Serviço de Radiologia da FUNFARME, principalmente ao Dr. *Antonio Soares Souza*, chefe do Serviço, à Dra. *Bárbara L. Pereira*, Dr. *Mauro T. Branco*, Dr. *Laécio L. Batista*, Dr. *Rafael A. Sanches* e Dr. *Marcos P. Muniz*, pela avaliação de todos os exames radiológicos dos pacientes.

Ao psicólogo *Nelson I. Valério* pela realização eficaz das avaliações psicológicas dos pacientes e à psicóloga *Érica A. Mazzi* pelo auxílio nas avaliações.

Ao Prof. Dr. *Wademir João Tadei*, coordenador do Curso de Pós-Graduação, e aos docentes desse curso, que sempre nos acompanharam com empenho e dedicação, buscando condições cada vez melhores para a pós-graduação desse Instituto.

Às bibliotecárias, em especial a *Maria Helena Lima*, pela presteza nos serviços de comutação bibliográfica.

À minha amiga muito querida e companheira de trabalho, Prof. Dra. *Agnes C. Fett Conte*, pela sua presença constante nos momentos de dificuldades e de realizações, colaborando significativamente para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. *Antonio Helio Oliani* e à Dra. *Denise C. Mos Vaz*, do Instituto de Medicina Reprodutiva e FUNFARME, pela amizade e confiança.

Aos queridos amigos pós-graduandos na Área de Genética desse Instituto, em especial à *Dorotéia R. S. Souza* e *Patricia F. Ribeiro*, e à *Neuseli Lamari* do Curso de Pós-Graduação da FUNFARME, pelo convívio amigo e solidário, principalmente na fase final da redação deste trabalho.

Aos funcionários do Polo Computacional, *José Antonio Queiroz*, *Jorge Luis Crestani. Tarlei Lodi* e *Maria Dolores Galisteu*, pela atenção e colaboração.

Às biólogas *Paula A. Buosi*, *Andrea R. B. Rossit*, *Rosana G. de Oliveira*, *Hyloia Sabbag* e *Paula Sandrin*, que estagiaram no Laboratório de Genética da FUNFARME e colaboraram na execução de experimentos da parte citogenética deste trabalho.

Às funcionárias do Serviço de Genética da FUNFARME, *Brasilina M. Martins* e *Valéria C. Ferrarese*, pela amizade e serviços técnicos-laboratoriais realizados sempre com muita dedicação.

Aos pacientes e as pessoas que gentilmente doaram sangue, sem os quais não seria possível realizar este estudo.

À *Nanci. A. Pereira*, chefe da Seção de Pós-Graduação, e as funcionárias *Onilda N. O. Okasaki*, *Rosângela B. Simonato* e *Oscar J. Marques*, pela atenção e pelos serviços prestados.

À funcionária *Soraia F. R. Soares* pelo desenho dos heredogramas e trabalho xerográfico, e a Sra. *Maria Aparecida A. de Marchi* pelo serviço de encadernação.

À Jetcolor do Rio Preto Shopping Center de S. J. Rio Preto, pelo patrocínio das fotos coloridas e aos funcionários *Sirlei S. Silva* e *Marcelo S. Martins* pela realização das fotos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia, da UNESP de S. J. Rio Preto, pelo apoio e estímulo.

À FUNFARME de S. J. Rio Preto, pelo apoio e incentivo, sempre com o objetivo de estimular a qualificação de seus docentes.

As agências financeiras CAPES e CNPq, pelos auxílios concedidos.

Ao Padre *Jarbas B. Dutra*, aos casais do Grupo São Francisco de Assis da paróquia da Redentora e aos participantes do Grupo de Jovens da FUNFARME, pelas orações e pelo convívio amigo.

Desejo, sobretudo, agradecer neste momento aos principais alicerces da minha vida, pela dedicação, sacrifícios e exemplos de vida que contribuíram para a concretização do meu ideal profissional: *Pedro* e *Terezina*, meus queridos pais.

Aos meus irmãos *Elder*, *Elvis*, *Elmer* e *Esli*, às minhas cunhadas *Cristina*, *Natalina*, *Marilda* e aos meus queridos sobrinhos *Ricardo* e *Elen* que com seus sorrisos, amizade e carinho sempre me estimularam a seguir em frente.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos Gerais 1
I.2. Base Genética da Neurofibromatose 2
I.3. Principais Características Clínicas 8
I.4. Tipos de Neurofibromatose 14
I.5. Instabilidade Cromossômica e Carcinogênese 17
I.6. Agentes Genotóxicos e Testes de Sensibilidade 19
I.7. Objetivos 22

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Estudo Genético-Clínico 24
II.2. Estudo Citogenético 26
A. Amostras 26
B. Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico e Análise Cromossômica 29
C. Análise Estatística 31

III. RESULTADOS

III.1. Avaliação Genético-Clínica 33
III.2. Estudo Citogenético 74
A. Experimento com Agentes Químicos BLM, MMC e BrdU 74
B. Experimento com Bleomicina e Raios X 91
C. Detecção de Indivíduos "sensíveis" ao Mutagênico Bleomicina 104

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

IV.1. Estudo Genético-Clínico 106
A. Sinais Clínicos 106
B. Classificação em tipos 125
C. Aconselhamento Genético 132
IV.2. Estudo Citogenético 136

V. RESUMO 149

VI. SUMMARY 151

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 152

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos Gerais

A neurofibromatose (NF) ou doença de von Recklinghausen é uma das entidades com padrão de herança autossômico dominante mais frequentes na espécie humana, com incidência estimada em um caso para cada 3.000 habitantes, afetando igualmente homens e mulheres de diferentes raças (RICCARDI, 1992).

Embora a NF tenha sido primeiramente relatada por Mark Akenside em 1768, e descrita por Friedrich Daniel von Recklinghausen, em 1882 (DUNN, 1987), os critérios clínicos para o seu diagnóstico só foram bem estabelecidos em Conferência realizada em Bethesda (EUA), em 1987 (NIH, 1988). De acordo com as conclusões desta Conferência, o diagnóstico da forma clássica de NF deve ser baseado na presença de pelo menos duas das seguintes características: seis ou mais manchas café-com-leite, dois ou mais neurofibromas ou um neurofibroma plexiforme, "sardas" nas regiões axilares e/ou inguinais, glioma óptico, dois ou mais nódulos de Lisch, e uma lesão óssea característica, como displasia esfenóide ou afilamento da córtex dos ossos longos com ou sem pseudoartroses. Outro critério diagnóstico é a recorrência familial, representada por pelo menos um parente de primeiro grau apresentando alguns dos sinais acima propostos (NIH, 1988).

Aos sinais básicos podem estar associados desde múltiplas malformações, em uma criança, a um tumor maligno em um adulto (WASSERTEIL **et al.**, 1987; HUSSON **et al.**, 1988; RODENHISER **et al.**, 1991). Essa diversidade se reflete até na própria classificação da doença, que tem sido considerada como uma facomatose, uma desordem hamartomatosa, uma condição neurocutânea ou uma neurocristopatia (SADDY **et al.**, 1985; CAREY **et al.**,1986; DUNN, 1987; JONES, 1988; RICCARDI, 1992), de acordo com algumas revisões encontradas na literatura.

Informações recolhidas em inúmeros estudos populacionais realizados na década de 80, em especial os coordenados por VICENT M. RICCARDI , na época atuando no Baylor College of Medicine em Houston (Texas, EUA) e atualmente no The Neurofibromatosis Institute em Pasadena (California, EUA), tem contribuído de modo significativo para um diagnóstico seguro da condição. Além disso, mais recentemente, a abordagem molecular tem sido relevante para o diagnóstico mais preciso e o entendimento da sua base genética.

I.2. Base Genética da Neurofibromatose

O gene responsável pela forma clássica de NF, designado NF1, foi primeiramente mapeado na região pericentromérica do cromossomo 17, por análise de ligação genética (BARKER **et al.**, 1987; SEIZINGER **et al.**, 1987a e 1987b). Subsequentemente, houve um progresso rápido nas técnicas moleculares, e foram identificadas várias sondas de DNA que detectavam polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) nessa região cromossômica (FAIN **et al.**, 1987; STEPHENS **et al.**, 1987; WHITE **et al.**, 1987). Foi também detectada ligação do gene NF1 com diversos marcadores moleculares do cromossomo 17, em grande número de familias afetadas (DIEHL **et al.**, 1987; FAIN **et al.**, 1987; PERICAK-VANCE **et al.**, 1987; SEIZINGER **et al.**, 1987a; STEPHENS **et al.**, 1987; UPADHYAYA **et al.**, 1987; WHITE **et al.**, 1987; SKOLNICK **et al.**, 1987; RODENHISER, 1991).

Desta forma, foi confirmado que o gene NF1 estava localizado no cromossomo 17. Estudos subsequentes (COLLINS **et al.**, 1989a; COLLINS **et al.**, 1989b; DIEHL **et al.**, 1989; FOUNTAIN **et al.**, 1989; O'CONNELL **et al.**, 1989; STEPHENS **et al.**, 1989) mapearam mais precisamente o gene NF1 em 17q12.22. Esses estudos facilitaram o isolamento, a clonagem e a caracterização do gene, que foram desenvolvidas por CAWTHON **et al.** (1990), VISKOCHIL **et al.** (1990) e WALLACE **et al.** (1990).

O gene NF1 é constituído por 51 exons distribuídos por cerca de 350 kb de DNA genômico, o que pode explicar a elevada taxa de mutações espontâneas. Pelo menos dois desses exons estão envolvidos no processamento alternativo do transcrito primário. O RNA mensageiro apresenta 8454 nucleotídeos e, com esses dois exons removidos, a leitura codifica uma proteína de 2818 aminoácidos, designada neurofibromina. A porção 5' do mapa do gene NF1, próxima a uma ilha de hipometilação CpG, corresponde a porção proximal do centrômero do cromossomo 17. Experimentos de sequenciamento e extensão de "primer" na extremidade 5' do gene têm mostrado sítios de início de transcrição, proximais ao sítio Not I que separa os fragmentos 350 kb e 150 kb, como mostra a Figura 1. A extremidade 3' não foi bem definida, mas sabe-se que o final da sequência codificante está contida dentro do fragmento Not I de 350 kb (MARCHUK **et al.**, 1991; GUTMANN **et al.**, 1993; VISKOCHIL **et al.**, 1993). Um dos introns de NF1 apresenta três outros genes, OMGP, EV12A e EV12B, que mostram transcrição em sentido oposto ao do gene NF1. Esses genes foram inicialmente localizados entre os pontos de quebra de translocação em dois pacientes com NF (CAWTHON **et al.**, 1990b; MIKOL **et al.**, 1990;

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

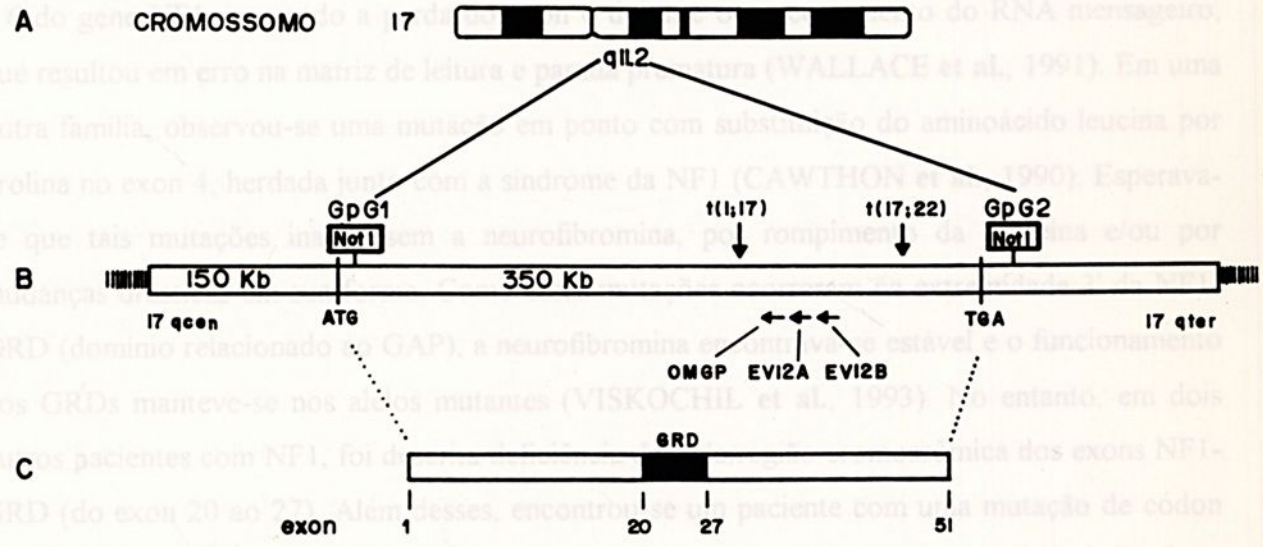


Figura 1. Representação esquemática do gene NF1. (**A**) Esquema do cromossomo 17. (**B**) Ampliação da região 17q12.22 contendo o gene NF1; mapa genômico do locus NF1 definido pelos sítios da enzima de restrição Not I e os códons de iniciação (ATG) e terminalização (TGA); e os três genes localizados entre os pontos t (1;17) e t (17;22) são representados por setas horizontais. (**C**) O gene NF1, o domínio relacionado ao GAP (GRD). CpG = ilhas de hipometilação.

O'CONNELL **et al.**, 1990; CAWTHON **et al.**, 1991; VISKOCHIL **et al.**, 1991), e foram os primeiros candidatos a codificadores da neurofibromina.

A observação de homologia na sequência de aminoácidos entre os peptídios da neurofibromina e domínios catalíticos das GAPs (proteínas que ativam a função GTPase) de mamíferos, e dos genes IRA1 e IRA2 de leveduras (BUCHBERG **et al.**, 1990) sugere que uma das funções da neurofibromina seja estimular a atividade GTPase do produto dos oncogenes RAS (VISKOCHIL **et al.**, 1993). Tal sugestão foi confirmada em experimentos bioquímicos e genéticos realizados principalmente por BALLESTER **et al.** (1990), MARTIN **et al.** (1990) e XU **et al.** (1990).

Inúmeras mutações têm sido identificadas em pacientes com NF1, incluindo translocações, deficiências de vários tamanhos e a presença de códons de terminalização precoce (CAWTHON **et al.**, 1990; VISKOCHIL **et al.**, 1990; ESTIVILL **et al.**, 1991; STARK, 1991). Um paciente com NF1 esporádica apresentou inserção Alu "de novo" no intron entre os exons 5 e 6 do gene NF1, causando a perda do exon 6 durante o processamento do RNA mensageiro, que resultou em erro na matriz de leitura e parada prematura (WALLACE **et al.**, 1991). Em uma outra família, observou-se uma mutação em ponto com substituição do aminoácido leucina por prolina no exon 4, herdada junto com a síndrome da NF1 (CAWTHON **et al.**, 1990). Esperava-se que tais mutações inativassem a neurofibromina, por rompimento da proteína e/ou por mudanças drásticas em sua forma. Como essas mutações ocorreram na extremidade 3' da NF1-GRD (domínio relacionado ao GAP), a neurofibromina encontrava-se estável e o funcionamento dos GRDs manteve-se nos alelos mutantes (VISKOCHIL **et al.**, 1993). No entanto, em dois outros pacientes com NF1, foi descrita deficiência de toda região cromossômica dos exons NF1-GRD (do exon 20 ao 27). Além desses, encontrou-se um paciente com uma mutação de códon de terminalização no início de GRD e um outro com uma deficiência em uma única base nitrogenada no meio de GRD, que causou erro na matriz de leitura. As neurofibrominas mutantes, nesses casos, mesmo se estáveis, provavelmente não se ligavam aos produtos dos genes RAS (VISKOCHIL **et al.**, 1993)

A penetrância do gene NF1 é completa, ou seja, sua capacidade de expressão quando presente tem sido estimada em 100% (SAMUELSSON e AXELSSON, 1981; RITTER e RICCARDI, 1985; RICCARDI e LEWIS, 1988). Contudo, a diversidade das manifestações clínicas em NF é muito ampla. A elevada variabilidade é expressa até no nível intrafamilial e um

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

paciente gravemente afetado pode ter descendentes levemente afetados e vice-versa. Alguns pacientes apresentam formas muito suaves das características, isto é, a expressividade da doença é tão leve que o diagnóstico fica significativamente dificultado.

Outra forma de NF, designada NF2, tem incidência estimada em um afetado para cada 50.000 habitantes, tendo a condição um padrão de herança autossômico dominante com penetrância maior do que 95% (SEIZINGER **et al.**, 1986; ROULEAU **et al.**, 1987).

Em contraste com os estudos relacionados ao gene NF1, o primeiro resultado de pesquisas para localização cromossômica do gene NF2 não foi obtido por análises de ligação genética, mas por estudos citogenéticos de tumores apresentados por pacientes com NF2, nos quais foram descobertas deficiências específicas do cromossomo 22 (SEIZINGER **et al.**, 1986; BARKER **et al.**, 1987; SEIZINGER **et al.**, 1987). No entanto, a confirmação da localização do gene NF2 no cromossomo 22 só pode ser obtida após análises de ligação genética. Os resultados dos estudos de ROULEAU **et al.** (1987 e 1990) mostraram forte ligação entre o gene NF2 e o marcador D22S1, sugerindo que o gene estaria localizado em 22q11.1-q13.1. A utilização de estudos combinados em famílias afetadas pela NF2 e com deficiência no cromossomo 22 em tumores, progressivamente localizaram o gene NF2 na banda q12 do cromossomo 22, estreitando a região na qual as pesquisas deveriam ser realizadas (ROULEAU **et al.**, 1990; WOLFF **et al.**, 1992). Pesquisas de segregação em familias afetadas pela NF2 e a caracterização de uma deficiência cromossômica em família com NF2 determinou o mapeamento do gene NF2 no intervalo entre os marcadores moleculares D22S212 e D22S22, uma região pequena o suficiente para sua clonagem. O gene NF2 foi então clonado concomitantemente por ROULEAU **et al.** (1993) e TROFATTER **et al.** (1993). A análise da sequência do DNA revelou 1785 nucleotídeos, responsáveis por uma proteína de 595 aminoácidos com massa molecular estimada em 66 kb, a qual foi denominada schwannomina. Esta designação derivou de schwannoma, o tumor mais frequente em NF2. Foi detectada homologia da schwannomina com a proteína 4.1 do eritrócito e com a família de genes ezrin/moesin/radixin, proteínas associadas com o citoesqueleto, sugerindo que a schwannomina se localiza na membrana celular e atua como uma proteína organizadora de membrana (ROULEAU **et al.**, 1993; TROFATTER **et al.**, 1993).

A alteração genética que produz a NF1 é considerada a mutação autossômica dominante mais comum na espécie humana (HUSON **et al.**, 1989, NORA FRAZER, 1991;

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

THOMPSON **et al.**, 1991; McKUSIK, 1992). CROWE **et al.** (1956, cf. HUSON **et al.**, 1988) estimaram a incidência desta mutação por gameta e por geração em 10^{-4}, concluindo que cerca de 50% dos pacientes apresentavam mutação genética nova, o que consiste em uma incidência extremamente alta.

Alguns pesquisadores levantaram a hipótese de um possível efeito da idade paterna como indutor de mutações produtoras de NF1 (RICCARDI, 1981c; RICCARDI **et al.**, 1984), à semelhança de outras doenças genéticas, como hemofilia A, síndrome de Lesch-Nyhan e acondroplasia. O fenômeno de associação com a idade paterna poderia ser explicado pelo fato da maioria das mutações novas, que produz essas doenças, ocorrer somente nas espermatogonias, uma vez que só elas sofrem divisão mitótica após o nascimento. Contudo, a maioria das mutações da NF1 parece nao ocorrer na mitose. Têm-se observado que os cromossomos paternos parecem ser mais susceptíveis a mutação do que os maternos. A causa de tal susceptibilidade não é bem conhecida, mas pode estar relacionada a diferenças nos padrões de metilação das células germinativas de origem paterna e materna, os quais podem ser associados ao "imprinting" genômico (JADAYEL **et al.**, 1990; STEPHENS **et al.**, 1992).

A associação da NF com o desenvolvimento de neoplasias tem levado a questionar se os genes já conhecidos, o NF1 e o NF2, podem ser oncogenes ou genes supressores de tumor. Os oncogenes têm um efeito positivo na proliferação celular, de forma direta ou indireta, através de respostas que influenciarão na aceleração da proliferação celular. A mutação em um oncogene pode levar a uma alteração em sua expressão, produzindo ou induzindo a multiplicação celular descontrolada (BISHOP, 1991; KELLY e JOHNSON, 1994). Os genes supressores de tumores têm um efeito negativo na proliferação celular, seu efeito direto bloqueia ou diminui a multiplicação celular. A mutação ou deficiência dos genes nos respectivos cromossomos homólogos causa a perda de supressão, resultando em proliferação celular descontrolada (MARSHALL, 1991; FEARON, 1994; KELLY e JOHNSON, 1994). Vários pesquisadores têm proposto que a perda do alelo remanescente em pacientes com NF1, por uma mutação somática, seja um possível mecanismo iniciador do tumor, como acontece no retinoblastoma (PONDER, 1990; GOLDBERG e COLLINS, 1991; LEGIUS **et al.**, 1993; ANDERSEN **et al.**, 1993), confirmando que o gene NF1 possa atuar como um supressor de tumor.

Outro achado que reforça tal conclusão é que o produto do gene normal deste loco

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

apresenta alta homologia com proteínas que ativam a função GTPase do produto dos oncogenes RAS. Isto sugere que a proteína NF1 normal interage com a proteína ras para o controle da proliferação celular, enquanto a proteína mutante perde tal capacidade, permitindo o aparecimento das neoplasias nos pacientes (SKUSE **et al.**, 1991; ANDERSEN **et al.**, 1993; LEGIUS, 1993; SEIZINGER, 1993).

Pesquisas em algumas linhagens celulares de neurofibrossarcomas tem mostrado níveis elevados de GTP-ras e expressão reduzida de neurofibromina, provavelmente produto de mutação no gene NF1 dessas células (GUTMANN e COLLINS, 1992).

Investigações realizadas em tumores benignos (SKUSE **et al.**, 1989 e 1991) e malignos (SKUSE **et al.**, 1989; MENON **et al.**, 1990; GLOVER **et al.**, 1991) de pacientes com NF1 mostraram a perda de heterozigose do cromossomo 17 na região do gene NF1 e em 17p apenas nos tumores malignos. Esses achados são ambíguos, pois a perda do alelo normal do gene supressor de tumor TP 53 mapeado em 17p pode contribuir para a progressão do tumor e levar a perda do cromossomo. No entanto, outros tumores malignos de pacientes com NF1 tem mostrado perda de heterozigose (LOH) específica para 17q. SKUSE **et al.** (1989 e 1990) observaram LOH em 17q em um astrocitoma e vários neurofibrossarcomas. Resultados semelhantes foram obtidos por PONDER **et al.** (1990), estudando feocromocitomas em pacientes com NF1. Esses resultados sugerem que a inativação de ambos os alelos do gene NF1 possa contribuir para o desenvolvimento de tumores malignos graves em NF1. A não observação de perda de heterozigose em neurofibromas sugere que outros eventos adicionais, além da inativação do segundo alelo do gene NF1, possa estar relacionado com o desenvolvimento de tumores benignos, embora a inativação do segundo alelo do gene NF1 por mecanismos mais sutis (mutações em ponto ou metilação) não tenham sido investigadas até o presente (VISKOCHIL **et al.**, 1993).

O gene NF2 também foi considerado um supressor de tumor. Vários estudos em tumores desses pacientes mostraram a perda de ambos os alelos do gene NF2 no cromossomo 22, corroborando sua atividade de supressão tumoral (COUNTURIER **et al.**, 1990; ROULEAU **et al.**, 1990; FIEDLER **et al.**, 1991; FONTAINE **et al.**, 1991a, 1991b; BIJLSMA **et al.**, 1992; WOLFF **et al.**, 1992).



I.3. Principais Características Clínicas

A. Manchas Café-com-leite

As manchas café-com-leite (MCCL- Figura 2) aparecem em cerca de 95% dos pacientes (RICCARDI, 1981a; WASSERTEIL **et al.**, 1987; JONES, 1988), estando presentes em número de seis ou mais em aproximadamente 75% dos casos (McKUSIC, 1992). Geralmente são congênitas, mas podem levar meses ou até anos para se tornarem evidentes, e aumentar progressivamente em número e tamanho durante a primeira década de vida. São distribuídas por toda a superfície corporal, mas sempre em menor número na face, e tem tamanho variável de 1 a 2 mm a mais de 50 cm. Essas manchas podem também ocorrer na forma de sardas axilares ou inguinais (CROWE, 1964; RICCARDI, 1981c; JONES, 1988; McKUSICK, 1992), ilustradas na Figura 2.

Um outro tipo de hiperpigmentação ocorre sobre toda a extensão dos neurofibromas plexiformes (Figura 3) que apresentam coloração mais escura que as MCCL (RICCARDI, 1980, 1981a). Hipopigmentação, geralmente em local de biopsia da MCCL ou cirurgia, e MCCL com duas tonalidades de pigmentação também podem ser encontradas mas são achados raros (RICCARDI, 1980).

B. Neurofibromas

Os neurofibromas, ilustrados na Figura 4, são tumores displásicos de textura amolecida derivados das células de Schwann que se localizam ao longo dos nervos principalmente nos tecidos subcutâneos e, em alguns casos, nos olhos, meninges, vísceras e vasos sanguíneos inervados pelo sistema nervoso autônomo. Apesar de serem tumores benignos, podem comprometer funções vitais, como a visão e audição, por compressão nervosa. Esses tumores apresentam tamanho variando desde poucos milímetros a um ou mais centímetros, geralmente apresentam coloração cárnea ou violácea e podem assumir várias formas, sendo sésseis ou pedunculados, cônicos ou lobulados (RICCARDI, 1981c; JONES, 1988).

Em certos casos, os neurofibromas acompanham todo o trajeto de um nervo atingindo grandes extensões, como mostrado na Figura 3, sendo denominados neurofibromas plexiformes (RICCARDI, 1981c, ALOI e MASSOBRIO, 1989).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



Figura 2. (**A**) Manchas café-com-leite (setas), caso 3-VM; (**B**) sardas axilares (seta), caso 32-ER.



Figura 3. Caso 21-GE, em (**A**) vista anterior mostrando neurofibroma plexiforme em braço direito com hiperpigmentação e em (**B**) vista lateral do neurofibroma.



Figura 4. Caso 6-AM, em (**A**) vista anterior e em (**B**) vista posterior mostrando múltiplos neurofibromas disseminados por todo o corpo.

C. Nódulos de Lisch

Os nódulos de Lisch, descritos em 1937 pelo alemão K. Lisch, são lesões hamartomatosas caracteristicamente bilaterais e bem definidas. Consistem em elevações gelatinosas da superfície da íris de forma arredondada, variando em coloração de transparente a amarelo ou marrom (Figura 5). Tais nódulos diferem do nevi íris devido a sua morfologia, são compostos de melanócitos e derivam da crista neural (LEWIS e RICCARDI, 1981; PERRY e FONT, 1982; BROWNSTEIN e LITTLE, 1983). A presença de nódulos de Lisch múltiplos é uma característica que parece ser exclusiva da sindrome da NF, sendo a característica mais comum nos adultos afetados pela condição, e não apresenta qualquer complicação oftalmologica (RICCARDI, 1981b; LUBS **et al.** 1991).

D. Outras manifestações menos frequentes

Várias complicações neurológicas estão associadas a NF, como é o caso de retardo mental, que aparece em cerca de 40% dos afetados (ROSMAN e PEARCE, 1967; RUBENSTEIN **et al.**, 1985; ELDRIDGE **et al.** 1989), a epilepsia e a macrocefalia (JONES, 1988; McKUSIC, 1992) além de distúrbios do desenvolvimento, como problemas de linguagem, hiperatividade, déficit de atenção e dificuldade motora (RUBENSTEIN **et al.**, 1985; ELDRIDGE **et al.** 1989), anormalidades neuroaudiológicas (PENSAK **et al.**, 1989) e neuropatias (THOMAS **et al.**, 1990).

As alterações ósseas encontradas em NF incluem escoliose, cifose, cifoescoliose, anomalias da coluna cervical, espondilolistesis, distúrbios do crescimento ósseo, pseudoartroses dos ossos longos, proliferação óssea subperiosteal, neoplasias ósseas (WINTER **et al.**, 1979; MORRISSY, 1982; CRAWFORD e BAGAMERY, 1986; LANDIM **et al.**, 1987) e meningocele intratoráxica (CHEE, 1989), sendo as deformidades de coluna e a pseudoartrose de tíbia os achados mais frequentes (CRAWFORD e BAGAMERY,1986).

O glaucoma é outra das manifestações oculares observadas, e alguns autores relacionam sua ocorrência com um prognóstico ruim (BURKE **et al.**, 1991). Também podem ocorrer lesões de retina (DESTRO **et al.** 1991; SIVALINGAM **et al.**, 1991), coróide, íris e buftalmia (BURKE **et al.** 1991).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

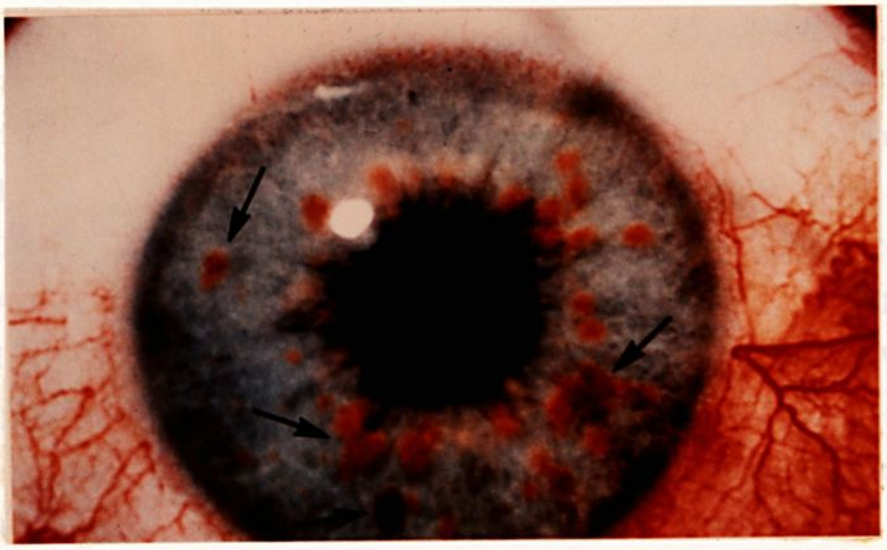


Figura 5. Nódulos de Lisch em íris (setas), caso 29-VM.

Outras alterações, como problemas vasculares (SCHIEVINK e PIEPGRAS, 1991), cardíacos (NOGAMI **et al.**, 1991), intestinais (BHATTACHARYYA e JAMIESON, 1988), ginecológicos (BLICKSTEIN e LURIE, 1990), hepáticos (ROMERO **et al.**, 1989), pulmonares (FAINTUCH **et al.**, 1990), bucais (GONZAGA **et al.**, 1991 e GEIST **et al.**, 1992) e endocrinológicos (LAVE **et al.**, 1985) foram também encontrados em pacientes com NF. Algumas são referidas raramente e outras com maior frequência, porém, como as descrições clínicas não costumam ser muito detalhadas, não há como fazer estimativas seguras a respeito da incidência dessas características nos pacientes com NF1.

E. Associação com neoplasias

Um aspecto muito interessante é a elevada frequência com que esses pacientes apresentam inúmeros outros tipos de tumores do sistema nervoso central, além dos neurofibromas. Entre eles, destacam-se gliomas ópticos, que ocorrem em cerca de 25% dos casos de NF (LEWIS **et al.**, 1984; DIAS **et al.** 1988; LUND e SKOVBY, 1991), astrocitomas (DESTRO **et al.**, 1991); neuromas acústicos nos casos de NF-2 (MARTUZA e OJEMANN,1982; ZANELLA **et al.**, 1987; SIVALINGAM **et al.**, 1991), neurilemmomas (SIVALINGAM **et al.**, 1991), meningiomas (RUBENSTEIN, 1984; SIVALINGAM **et al.**, 1991), ganglioneuromas (PARIZEL **et al.**, 1991) e outros tipos mais raros.

Uma das complicações mais sérias em NF é o desenvolvimento de neoplasias malignas (HOPE e MULVIHILL, 1981; BADER, 1986; MOSSO **et al.**, 1987). O neurofibrossarcoma ou schwannoma maligno é o câncer mais comum em NF (NEVILLE **et al.**, 1991). No entanto, inúmeras outras neoplasias malignas foram descritas em pacientes com NF, como feocromocitomas (ROSEMBERG **et al.**, 1990; STRAUSS **et al.**, 1990), rabdomiossarcomas (MOSSO **et al.**, 1987), tumor de Wilms (SANDBERG, 1990), schwannomas pancreáticos (WALSH e BRANDSPIGEL, 1989), tumores ósseos (SCHNEIDER **et al.**, 1986; SORENSEN **et al.**, 1986), tumores de células granulares cutâneas (MARTIN **et al.**, 1990), carcinomas (GRIFFITHS **et al.**, 1983; YOSHIDA **et al.**, 1991), melanomas (SILVERMAN **et al.**, 1988; ANTLE **et al.**, 1990), sarcomas (MARTLEY **et al.**, 1990) e leucemias (SCHNEIDER **et al.**, 1986; SANDBERG, 1990).

A malignização ocorre, de acordo com certos autores, em até 40% dos casos (SOIDILLO **et al.**, 1980; ENZINGER e WEISS, 1983; SILVERMAN, 1990). Contudo, outros

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

autores referem frequências de malignização mais baixas, em torno de 5 a 10% (JONES, 1988; HARTLEY, 1990), de 3% a 15% (BADER, 1986; SCHNEIDER **et al.**, 1986; MCKUSICK, 1992) ou 10% a 15% (WANDER e DAS GUPTA, 1977; RICCARDI, 1989).

I.4. Tipos de Neurofibromatose

A NF é uma das doenças humanas que melhor exemplificam o fenômeno da expressividade genética, ou seja, a variabilidade de sinais físicos ou clínicos associados a um dado gene. Essa variação pode ser detectada em pelo menos tres níveis: (a) no nível temporal, por tratar-se de entidade na qual o aparecimento das características clínicas é progressivo; (b) no nível individual, por ser a NF altamente variável em suas manifestações de um indivíduo para outro, até entre membros de uma mesma família; e (c) no nível genético e fisiopatológico, em função da diversidade nas alterações moleculares encontradas em diferentes famílias. Assim sendo, é importante a tentativa de fazer um diagnóstico mais específico de diferentes tipos.

RICCARDI (1982) classificou a NF em oito tipos, cujas designações, características clínicas e padrões de herança são resumidos na Tabela 1. A definição dos diferentes tipos de NF depende essencialmente da variação de ocorrência, quantidade e distribuição das principais características definidas e das complicações associadas, particularmente as relativas aos tumores do sistema nervoso.

A grande maioria das considerações referidas nesta Introdução refere-se a NF clássica ou do tipo 1 (NF1), que é a entidade descrita por von Recklinghausen em 1882 (CRUMP, 1981) e compreende cerca de 90% dos casos diagnosticados de NF. A NF2, também denominada NF acústica ou central, é caracterizada pela presença de neuromas acústicos derivados do oitavo nervo craniano, frequentemente acompanhados por outros neoplasmas do sistema nervoso central (MARTUZA, 1984; HUSON e THRUSH, 1985; SADEH **et al.**, 1989; MULTIHILL **et al.**, 1990; PARRY **et al.**, 1991). Os critérios diagnósticos para a NF2 compreendem, portanto, a presença de massa tumoral no oitavo nervo craniano bilateral, diagnosticada por técnicas de imagem apropriadas (tomografia computadorizada ou ressonância magnética) e um parente em 1º grau com diagnóstico de NF2 ou com massa tumoral no oitavo nervo craniano unilateral. Não havendo história familial, confirma-se o diagnóstico com a presença de duas das seguintes características: neurofibroma, meningioma, glioma, schwannoma

Tabela 1. Características e padrões de herança dos tipos de neurofibromatose, segundo Riccardi (1982).

Tipo	Padrão de herança	Características clínicas
1. Neurofibromatose clássica	AD*	MCCL**, neurofibromas, nódulos de Lisch, sardas axilares, anormalidades ósseas e neurológicas, neoplasias benignas e malignas
2. Acústica	AD	Neuromas acústicos bilaterais, poucas MCCL e neurofibromas
3. Misto	AD	Combinação de 1 e 2
4. Variante	Desconhecido	Variações nas MCCL, neurofibromas, neoplasmas do SNC, nódulos de Lisch
5. Segmentar	Não herdável	Neurofibromas segmentares e/ou MCCL
6. MCCL familial	Desconhecido	MCCL
7. Início tardio	Desconhecido	Após 3ª década de vida, apenas neurofibromas
8. Não-especificada	Desconhecido	Sinais variáveis

* AD=autossômico dominante;

** MCCL= Manchas café-com-leite

e opacidade lenticular sub-capsular posterior juvenil (ZANELLA **et al.**, 1987; PASTORES **et al.**, 1991).

A NF3 ou tipo "misto" apresenta uma mistura das características de NF1 e NF2 e também tem padrão de herança autossômica dominante (WERTELLECKI **et al.**, 1981; RICCARDI, 1982; CAREY **et al.** 1986).

A NF4 ou tipo "variante" caracteriza-se pela presença de MCCL e neurofibromas em pelo menos duas partes do corpo, os nódulos de Lisch, tumores do sistema nervoso central, e algumas características clínicas não encontradas em NF1. Seu padrão de herança foi considerado desconhecido por RICCARDI (1982).

A NF5 ou tipo segmentar é caracterizada pela presença de neurofibromas e/ou MCCL limitados a uma região do corpo, frequentemente unilaterais.

Os afetados pela NF6 ou tipo MCCL familial apresentam MCCL como característica única, não têm neurofibromas ou tumores derivados da crista neural, e podem apresentar outras características não específicas, como alterações neurológicas e peito escavado. Essas características haviam sido relatadas em uma família por RICCARDI (1980).

A NF7 ou tipo de início tardio caracteriza-se pelo aparecimento de neurofibromas durante ou após a terceira década de vida. Este tipo foi considerado com padrão de herança desconhecido, pois só haviam sido descritos casos esporádicos (RICCARDI, 1982; BOUSEMA **et al.**, 1989).

RICCARDI (1982) denominou de NF8 ou "tipo não especificado" os casos de NF que não se encaixavam nos sete tipos acima descritos.

A classificação de tipos proposta por RICCARDI (1982) não tem sido aceita por todos pesquisadores e clínicos, porque inclui formas de difícil definição e distinção clínica, como é o caso do tipo 3, que é considerado "misto", do tipo 4 que é "variante", do tipo 7 que é de "início tardio" e o tipo 8 que é "não especificado".

Após a publicação de Riccardi em 1982, CAREY **et al.** (1986) propuseram que a NF fosse dividida em apenas 5 tipos, com base nas características clínicas distintas e nas implicações genéticas para o paciente. O tipo 1 e 2 são correspondentes a classificação de RICCARDI (1982), o tipo 3 corresponde a NF segmentar, o tipo 4 é a MCCL familial e o tipo 5 é a NF com fenótipo Noonan. Este último tipo tem sido diagnosticado por vários pesquisadores (ALLONSON **et al.**, 1985; MENDEZ, 1985; OPTIZ e WEAVER, 1985; KAPLAN e ROSENBLATT, 1985; MEINECKE, 1987). Os afetados por NF com fenótipo Noonan

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

apresentam algumas das características comuns a NF clássica, como neurofibromas, MCCL, sardas axilares, nódulos de Lisch, entre outras, assim como algumas das características presentes na síndrome de Noonan como ptose palpebral, hipoplasia malar, fissuras palpebrais para baixo, hipertelorismo ocular, pescoço curto, implantação baixa de cabelos na nuca, baixa estatura, cardiopatias, retardo mental e hipotonia.

Diante de tal complexidade, é muito importante que continuem sendo realizados estudos com o objetivo de descrever detalhadamente as características genético-clínicas de pacientes com NF e de identificar critérios diagnósticos mais objetivos para sua classificação em tipos.

I.5. Instabilidade Cromossômica e Carcinogênese

Diversas síndromes genéticas associadas com o desenvolvimento de neoplasias, como é o caso da NF, manifestam o fenômeno de instabilidade cromossômica, evidenciado pelas frequências elevadas com que ocorrem aberrações cromossômicas e trocas entre as cromátides-irmãs em células cultivadas. Contudo, os estudos desta natureza em pacientes com neurofibromatose ainda nao são conclusivos.

De modo geral, a taxa de mutação é um fator fortemente relacionado com a transfomação celular. Quanto mais elevada for a taxa de mutação, maior é a probabilidade de se acumularem, em um certo local, as alterações genéticas necessárias para o aparecimento de uma neoplasia. Levando isso em consideração, é interessante considerar o efeito de agentes mutagênicos em indivíduos portadores de síndromes associadas com instabilidade cromossômica.

O fenômeno de instabilidade cromossômica, em nível muito mais discreto, também pode ser identificado em indivíduos não-portadores de quadros sindrômicos. Foi verificado que indivíduos aparentemente normais exibem graus variados de sensibilidade cromossômica em resposta a agentes mutagênicos, como a bleomicina (HSU **et al.**, 1989), e que essa característica é em grande parte hereditária, tendo sido seu coeficiente de herdabilidade estimada em torno de 85%, em estudos com gêmeos mono e dizigóticos (LUCCA & BARTHOLOMEI, 1993). Esses achados sugerem que certos indivíduos apresentam um grau de predisposição ao aparecimento de mutações cromossômicas, pelo menos quando expostos a agentes mutagênicos. Em consequência, essa sensibilidade aos agentes mutagênicos pode se associar a uma predisposição ao aparecimento de neoplasias.



Essa associação foi testada por alguns pesquisadores e ficou demonstrado que os perfis distribucionais de lesões cromossômicas induzidas pela bleomicina nos pacientes com câncer de cólon, do trato digestivo superior e do pulmão diferiam significativamente do perfil encontrado nos indivíduos controles normais. Considerando 0,8 quebras por célula como limiar de hipersensibilidade à droga, HSU **et al.** (1989) verificaram que cerca de 40% a 50% dos pacientes com as referidas neoplasias se enquadravam na classe dos hipersensíveis, enquanto que cerca de 11% dos controles o faziam. Esses autores concluíram que a sensibilidade a mutagênicos deve desempenhar um papel importante na carcinogênese de órgãos e tecidos que tem contato direto com o ambiente externo, e sugeriram que tal característica poderia ser usada de forma efetiva para a identificação de pessoas em situação de risco de manifestarem câncer.

Logo a seguir, em estudo prospectivo, alguns desses mesmos pesquisadores (SCHANTZ **et al.**, 1990) verificaram que pacientes com tumores de cabeça e pescoço, que eram sensíveis a bleomicina, desenvolviam precocemente outros tumores primários com maior frequência do que os pacientes menos sensíveis. Essa resposta era independente de variáveis como idade, sexo, exposição a álcool e fumo e tipo de tratamento do câncer primário.

Alguns outros estudos foram realizados em famílias que manifestam predisposição ao câncer, utilizando testes com agentes mutagênicos para observar instabilidade cromossômica. LIANG **et al.** (1989) investigaram treze membros de uma família com vários tipos de cânceres, utilizando a metodologia de HSU **et al.**(1989) e encontraram frequências aumentadas de danos cromossômicos nesses pacientes. Com o mesmo objetivo, NOTGHI **et al.** (1990) investigaram as frequências de aberrações cromossômicas em fibroblastos cultivados de pacientes com cirrose biliar primária, uma doença autoimune, que apresenta incidência aumentada de câncer, principalmente carcinoma de mama (GOUDIE **et al.**, 1985; MILLS **et al.**, 1982). Seus resultados revelaram maior instabilidade cromossômica espontânea e sensibilidade aumentada a BLM nos pacientes, quando comparados com os resultados obtidos nas culturas de indivíduos controles, que foi assumida como uma possível explicação para a incidência aumentada de neoplasias.

ROBBINS **et al.** (1985) e CHERRY **et al.** (1992) também encontraram instabilidade genética em pacientes portadores da doença de Alzheimer, que se caracteriza por degeneração neurológica. Em indivíduos com síndrome de Down, que apresentam incidência aumentada de leucemia e doença de Alzheimer, não foi encontrada instabilidade cromossômica espontânea. No entanto, quando adicionada BLM nas culturas celulares desses pacientes, foram

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

observadas frequências aumentadas de alterações cromossômicas em comparação aos controles (VIJAYALAXMI e EVANS, 1982; IIJIMA **et al.**, 1984; LEONARD e MERZ, 1989;SANKARANARAYANAN **et al.**, 1990).

Esses interessantes estudos reforçam a hipótese de que a sensibilidade a mutagênicos, presumivelmente resultante de deficiência em alguns passos do sistema enzimático de reparo do DNA, seja associada ao risco aumentado de desenvolver múltiplas neoplasias. Nesse caso, a bleomicina seria um composto interessante para ser usado na detecção de indivíduos que se encontram em situação de risco, por apresentarem baixa eficiência no sistema de reparo do DNA.

1.6. Agentes genotóxicos e testes de sensibilidade

A bleomicina (BLM), amplamente utilizada terapeuticamente em vários protocolos antineoplásicos é um agente mutagênico radiomimético, que atua como degradante de DNA, produzindo quebras uni e bicatenarias. Esse efeito decorre principalmente da ligação com íons ferrosos, o que facilita sua oxidação e gera compostos genotóxicos como radicais livres (CROOKE, 1979; LOPEZ-LARRAZA e BIANCHI, 1993), podendo causar a morte celular (GIACCIA et al., 1991; HAY **et al.**, 1991; POVIRK e AUSTIN, 1991). A BLM também pode degradar o DNA ligando-se ao vanádio e ao magnésio na presença de peróxido de hidrogênio (BURGER **et al.**, 1984; EHRENFELD **et al.**, 1984; KUWAHARA **et al.**, 1985), ao cobalto quando ativado pela luz (CHANG **et al.**, 1984; SUZUKI **et al.**, 1984) e ao cobre (EHRENFELD **et al.**, 1985). Nesta última situação, há controvérsias de como o complexo com o cobre é capaz de degradar o DNA (HAI **et al.**, 1991).

Além de atuarem sobre o DNA como agentes degradantes, os compostos mutagênicos podem atuar de outras maneiras, como por reações de alquilação e intercalação. Os agentes alquilantes são compostos eletrofílicos altamente reativos, capazes de introduzir radicais alquilas ou metilas nos átomos nucleófilos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre de nucleotídeos ou proteínas. A alquilação do DNA leva a um pareamento errôneo, que se manifesta como uma mutação após a duplicação da molécula original e interfere, desse modo na transcrição. Todo o metabolismo de síntese protéica e o metabolismo energético celular são comprometidos. Altas doses de alquilantes são capazes de lesar as células em quaisquer das etapas do ciclo celular (KOROLKOVAS e BURCKHAETER, 1982). DOEJER **et al.** (1984) evidenciaram a

ocorrência de vários sítios sensíveis a alquilação do DNA, como o N1, o N3 e o O6 da guanina e o N3 da citosina. Mas o sítio preferencial de atuação dos alquilantes é a posição N7 da guanina (SHEPHERD e SAGE, 1986). Quando o agente se liga a esse sítio, ocorre a desestabilização da ligação glicosídica do N7 da pentose, causando a perda da base, ou seja, a despurinação. Isto pode provocar a ruptura da cadeia do DNA, a substituição da guanina por qualquer uma das outras bases, levando a um pareamento errôneo ou, ainda, a ligação entre guaninas próximas, produzindo ligações cruzadas que impedem a duplicação do DNA (CARTER **et al.**, 1981).

Um dos agentes mutagênicos alquilantes mais conhecidos é a mitomicina C (MMC) utilizada terapeuticamente em diversos protocolos antineoplásicos. A MMC deve sua ação as ligações cruzadas entre as cadeias complementares do DNA (ISHII, 1981; NATARAJAN **et al.**, 1983). Isso é possibilitado por uma pré-ativação **in vivo**, com redução de seu anel quinônico e perda do grupo metóxi terciário (KOROLKOVAS e BURCKHAETER, 1982). Em consequência, a MMC adquire forma protonizada ativa capaz de atuar como agente alquilante bifuncional, tendo uma cadeia de quatro átomos de carbono que separam os centros ativos.

Os agentes intercalantes introduzem-se erroneamente em uma das cadeias da molécula de DNA durante o processo de síntese,porque se assemelham a uma base nitrogenada normal. Por ocasião da duplicação seguinte, acabam se pareando com uma base nitrogenada, levando a inserção de um nucleotídeo extra na molécula-filha. Um dos mais conhecidos agentes intercalantes é a bromodesoxiuridina (BrdU)(MORRIS, 1991).

Inúmeros estudos desenvolvidos para verificar efeito da MMC sobre os cromossomos não encontraram aumento nas frequências de alterações cromossômicas em linfócitos de pacientes com neoplasia de cérvix uterina (ADHJARYU **et. al.**, 1985; MURTY **et al.**, 1987), e adenomatoses de cólon e reto (HEIM, 1985), e melanoma e tumor de cólon (LI **et al.**, 1982; WIENEKE **et al.**, 1982). Apenas SHIRAISHI **et al.** (1979) referiram indução de trocas entre cromátides-irmãs por MMC em indivíduos com leucemia e linhagens celulares de linfoma.

Em relação ao agente BrdU, não foram encontrados resultados de investigações científicas sobre a resposta ao seu efeito em indivíduos supostamente sensíveis a agentes mutagênicos. Todavia, sempre que se analisa a frequência de lesões cromossômicas induzidas por um dado agente, o efeito final é produzido também pelas reações de metabolização que o composto sofre no indivíduo testado, e por sua capacidade de reparar as lesões sofridas. Portanto, os sistemas enzimáticos de metabolismo e de reparo do DNA do indivíduo testado

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

estão sempre sendo analisados em conjunto com o efeito do agente mutagênico, podendo não só dificultar a interpretação dos dados, como mesmo levar a conclusões falsas.

Mais recentemente, AU **et al**. (1991) desenvolveram um teste que pretende eliminar os demais fatores associados com a resposta final, que denominaram " challenge assay ". Nesse teste, as células são submetidas a doses padronizadas de radiação ionizante, que induzem quebras na molécula do DNA. O agente físico não é submetido aos problemas da metabolização como os agentes químicos, portanto este aspecto da questão é eliminado no "challenge assay". A análise é feita nas células no primeiro ciclo de divisão após o tratamento, ou seja, aquelas que passaram por uma única oportunidade de reparo. A identificação das células que estão no primeiro ciclo de divisão é possibilitada pela adição de 5-bromodesoxiuridina após a exposição ao agente genotóxico, e posterior marcação diferencial das cromátides irmãs por protocolo rotineiramente usado em laboratórios de citogenética (VARELLA-GARCIA, 1991).

O teste é baseado no fato de que a reação entre o agente físico e químicos com o DNA e as enzimas de reparo possa interferir no processo de reparo do DNA, até mesmo em doses baixas. Desse modo, pode-se testar essa hipótese, submetendo as células a agentes indutores, como os raios X. Assim, os danos causados pelo agente físico não serão reparados corretamente e poderão não religar os fragmentos da molécula original. Esses produtos reparados anormalmente podem, então, ser detectados como aberrações cromossômicas. Esse teste parece ser bastante conveniente pois, ao contrário do que acontece em relação aos agentes químicos, o efeito da radiação não é alterado pelas etapas metabólicas que se processam na célula.

A radiação ionizante é um eficiente indutor de aberrações cromossômicas e foi um dos primeiros agentes carcinogênicos bem documentados pela literatura científica. Por isso, foi proposta como o agente "desafiante" no "challenge assay". As principais lesões induzidas pela radiação ionizante são de quatro tipos: quebras em uma única fita de DNA, quebra nas duas fitas, diferentes tipos de danos nas bases e ligação cruzada proteína-DNA (NATARAJAN **et al.**, 1986; CALDECOTT e JEGGO, 1991), sendo que as quebras nas duas fitas e os danos nas bases são considerados os tipos de lesões com maior probabilidade de ocorrência (NATARAJAN, 1983). Tais lesões são visualizadas citogeneticamente como anéis acêntricos, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos, figuras trirradiais, cromossomos em anel, translocações, cromossomos com deficiência intersticial ou terminal (BENINSON **et al.**, 1986).



A investigação de radiossensibilidade tem sido realizada em células de várias doenças genéticas que predispoem ao câncer. Fibroblastos de indivíduos com ataxia-telangiectasia (BIGELOW **et al.**, 1979; PARSHAD **et al.**, 1985b), anemia de Fanconi, xeroderma pigmentosum, síndrome de Bloom, síndrome de Gardner e polipose familial (PARSHAD **et al.**, 1983; 1985a; 1985b), disqueratose congênita ou síndrome de Zensser-Cole-Engman (DeBAUCHE **et al.**, 1990) demonstraram frequências aumentadas de aberrações cromossômicas após tratamento com raios X.

Diversas pesquisas utilizando os raios X como indutores de aberrações cromossômicas, foram realizadas em linfócitos de indivíduos portadores das síndrome de Down, com o objetivo de testar a capacidade de reparo (ATHANASIOU **et al.**, 1980; PRESTON, 1981; VIJAYALAXMI e EVANS, 1982; LEONARDI e MERZ, 1983; MORIMOTO **et al.**, 1984; SHAFIK **et al.**, 1987, 1988; MacLAREN **et al.**, 1989). Os resultados foram sempre positivos, ou seja, os indivíduos portadores de síndrome de Down apresentaram sensibilidade aumentada aos raios X.

Diante desses resultados, parece interessante utilizar um conjunto de agentes mutagênicos que apresentem mecanismos de ação diferentes para testar a hipótese de sensibilidade a esses agentes.

I.7. Objetivos

A NF é uma das doenças autossômicas dominantes mais frequentes na espécie humana e com expressividade extremamente variável, dificultando muitas vezes seu diagnóstico, classificação em tipos e, consequentemente, o aconselhamento genético. Além disso, esta condição frequentemente se associa à neoplasias. Com a finalidade de contribuir para o esclarecimento de alguns desses problemas, a presente investigação teve como objetivos:

(a) Investigar aspectos genético-clínicos em pacientes portadores de NF, visando classificá-los nos diferentes tipos propostos pela literatura. Essas informações devem propiciar uma melhor verificação dos padrões de herança, levantamento das características clínicas importantes para o diagnóstico, frequência dessas características e aplicação no aconselhamento genético;

(b) Avaliar a frequência de aberrações cromossômicas estruturais espontâneas e após exposição a agentes genotóxicos com diferentes mecanismos de ação sobre o DNA, como o degradante bleomicina, o alquilante mitomicina C e o intercalante 5-bromodesoxiuridina e os

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

raios X, em cromossomos metafásicos de linfócitos de sangue venoso periférico de pacientes portadores de NF. Esses dados permitem verificar se existe diferença na resposta aos agentes genotóxicos, tanto comparando a razão entre as alterações induzidas e as espontâneas nos pacientes, como comparando as respostas entre pacientes e controles.

I. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Estudo genético-clínico

Foram estudados 67 pacientes atendidos no Serviço de Genética do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto. Os pacientes pertenciam a 43 famílias não-relacionadas e apresentavam idades variando de 2 a 61 anos, com média e desvio padrão de 31,0 ± 16,8 anos. Trinta e nove pacientes (58%) eram do sexo feminino e vinte e oito (42%) do sexo masculino. Alguns casos foram encaminhados ao Serviço de Genética por outras áreas médicas, principalmente pelos Serviços de Dermatologia e Oftalmologia e muitos dos pacientes foram selecionados pela detecção de neurofibromas em exames histopatológicos prévios. Os pacientes identificados desta forma foram convidados, via postal, para comparecerem ao Serviço para melhor avaliação clínica, tendo em vista que poderiam ser portadores de uma doença genética. Desses, catorze indivíduos de diferentes famílias não responderam. Nos casos de recorrência na família, foi solicitada a presença dos outros membros afetados, no entanto, a grande maioria não compareceu. Na primeira entrevista, o paciente era esclarecido que a investigação sistematizada faria parte de um trabalho de pesquisa, desde que houvesse sua total concordância. Os que compareceram, ou seja, 67 indivíduos, concordaram em ser examinados, a realizarem os exames. Alguns se recusaram a fazer determinados exames e/ou avaliações mais específicas, ou a serem fotografados.

A coleta de informações foi realizada de acordo com ficha padronizada (Anexo 1), contendo dados de identificação individuais e familiais, antecedentes pessoais e familiais, incluindo o heredograma, dados do exame físico e dos demais exames solicitados, incluindo as interconsultas de outras áreas médicas. Os heredogramas foram construídos segundo as normas do "American Journal of Medical Genetics" (1984). Além do propósito, todos os assinalados com "asterisco" foram examinados. Informações sobre os demais indivíduos foram obtidas através dos próprios pacientes.

Os dados antropométricos obtidos foram comparados com as curvas de normalidade estabelecidas para a população geral segundo a Tabela de Tanner-Whithehouse de 1966 (JONES, 1988).

Os exames laboratoriais solicitados foram hemograma e dosagens de sódio, potássio, uréia e creatinina, que são considerados exames de rotina para avaliação geral do paciente,além

da glicemia em jejum, que foi requerida com o objetivo de detectar alterações na taxa de glicose no sangue, um dos sinais apresentados pelos pacientes com NF.

A avaliação oftalmológica foi realizada em todos os casos, pois a presença de nódulos de Lisch é muito dificil de ser verificada a olho nú, necessitando de observação por lâmpada de fenda. Além disso, havia interesse em se detectar outras alterações oculares associadas à síndrome.

A avaliação pelo otorrinolaringologista foi solicitada sempre que o paciente apresentava queixas de distúrbio de audição, dor local, zumbido ou tonturas.

Para detecção de problemas ósseos foram feitas radiografias de tórax, coluna cervical, torácica e lombar, membros superiores e inferiores, e crânio, neste último caso também para observação de alterações de perímetro cefálico e calcificações intracranianas.

Com o objetivo de detectar retardo mental e outras disfunções neurológicas e psicossociais foi realizada uma avaliação psicológica envolvendo aspectos relativos à inteligência (QI), rendimento perceptivo-motor, indícios de comprometimento neurológico, depressão, ansiedade e distúrbio de déficit de atenção por hiperatividade. Para isso 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 alta ou severa.

Solicitou-se, ainda, eletroencefalograma e eletrocardiograma, pois muitos pacientes com NF apresentam convulsões, problemas cardíacos e hipertensão arterial. Nos casos em que o paciente referiu cefaléias frequentes, dormência de alguma parte do corpo e perda de força muscular, foi requerida avaliação por especialista em neurologia, o qual, na maioria dos casos, solicitou tomografia computadorizada.

Outras avaliações foram solicitadas em caso de queixas clínicas específicas e a grande maioria dos pacientes foi encaminhada a diversas outras áreas médicas após os resultados de exames laboratoriais, radiológicos e eletroencefalográficos, entre outros.

A documentação fotográfica dos pacientes foi feita com máquina fotográfica Pentax K 1000 e flash Maxwell 222-H utilizando-se filmes coloridos de 100 ASA (Kodak, Fuji ou Agfa).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

II.2. Estudo citogenético

A. Amostras

O estudo citogenético foi realizado em 21 dos 67 pacientes avaliados na pesquisa genético-clínica. Esses pacientes foram selecionados por sua presença no Serviço na semana em que se pretendia iniciar outro grupo para análise citogenética, e todos eram provenientes de diferentes famílias. Dezesseis pacientes eram do sexo feminino e cinco do sexo masculino. Suas idades variavam de 9 a 58 anos, com média e desvio padrão de 34,76 ± 15,59 anos.

O estudo citogenético foi realizado através de dois experimentos. No primeiro (experimento I), foi pesquisada instabilidade cromossômica espontânea e induzida pelos agentes químicos BLM, MMC e BrdU, em 10 pacientes e em sete indivíduos controles. No segundo (experimento II), foi também realizada a pesquisa de instabilidade cromossômica espontânea e a induzida foi feita após exposição a BLM e aos raios X, utilizando-se neste último caso a técnica "challenge assay" (AU **at al.**, 1991), em 11 pacientes e nove indivíduos controles.

Os pacientes que participaram do experimento I foram designados PI e os que participaram do experimento 2 foram designados PII. Na Tabela 2 é apresentada a caracterização das amostras PI e PII, por idade, sexo, grupo étnico e diagnóstico de cada indivíduo doador de sangue para os exames citogenéticos. Em todos os casos, os códigos de identificação dos pacientes são os mesmos usados no estudo clínico, onde as características clínicas são amplamente discutidas.

A amostra controle constituiu-se de 16 indivíduos saudáveis, que não sofreram exposição a agentes mutagênicos conhecidos, foram pareados por sexo e idade com os pacientes, sendo 11 do sexo feminino e 6 do sexo masculino. Os controles são descritos na Tabela 3 em relação a idade, sexo e atividade profissional desenvolvida. As idades variaram de 6 a 55 anos, com média e desvio padrão de 31,68 ± 15,39 anos. Os indivíduos que doaram sangue para os exames citogenéticos do experimento I foram designados CI e os do experimento II foram designados CII. Nenhum dos indivíduos utilizados como doadores de sangue para esse estudo era fumante, todos tinham dieta alimentar e consumo de bebida alcoólica dentro de padrões usuais. Além disso, não tinham recebido radiação, feito uso de medicamentos ou contraído doença viral próximo aos testes aplicados neste estudo.



Tabela 2. Caracterização dos indivíduos portadores de neurofibromatose (amostra P).

Amostra	Indivíduo	Idade	Sexo	Grupo Étnico	Diagnóstico
P1					
	14 SA	22	F	Negróide	NF1
	16 AS	32	M	Caucasóide	NF1
	1 VR	10	F	Negróide	NF1
	12 MN	20	F	Caucasóide	NF1
	8 LC	18	M	Negróide	NF1
	2 LS	14	M	Negróide	NF1
	29 IM	57	F	Negróide	NF1
	9 IT	47	F	Caucasóide	NF1
	19 MP	53	F	Caucasóide	NF1
	32 FR	51	F	Negróide	NF1
P2					
	21 GE	25	F	Caucasóide	NF5
	28 MJ	31	F	Caucasóide	NF1
	5 EB	58	F	Negróide	NF1
	3 AP	38	M	Caucasóide	NF1
	7 LT	50	F	Negróide	NF1
	17 MS	49	F	Caucasóide	NF1
	18 MA	34	F	Caucasóide	NF6
	10 RP	28	F	Caucasóide	NF1
	23 MU	41	F	Negróide	NF1
	20 AB	43	F	Caucasóide	NF1
	33 RF	09	M	Caucasóide	NF1

NF1 = NF clássica; NF5 = NF segmentar; NF6 = NF MCCL familial.

Tabela 3. Caracterização dos controles (amostra C).

Amostra	Indiv.	Idade	Sexo	Grupo Étnico	Atividade profissional
C1					
	1 GS	21	F	Negróide	Estudante
	2 LJ	34	M	Caucasóide	Técnico em elevadores
	3 AN	09	F	Caucasóide	Estudante
	4 PB	20	F	Caucasóide	Universitário
	5 AD	17	M	Caucasóide	Estudante
	6 MR	55	F	Caucasóide	Secretária
	7 DB	06	M	Caucasóide	Estudante
C2					
	8 EB	24	F	Caucasóide	Estudante
	9 IG	32	F	Negróide	Estudante
	10 LA	57	F	Caucasóide	Do Lar
	11 NS	36	M	Caucasóide	Hematologista
	12 MM	50	F	Caucasóide	Faxineira
	13 CR	49	F	Negróide	Do Lar
	14 LG	34	F	Caucasóide	Secretária
	15 JA	30	M	Caucasóide	Escriturário
	16 SP	33	F	Caucasóide	Secretária

B. Culturas de linfócitos do sangue periférico e análise cromossômica

Os linfócitos do sangue periférico foram cultivados segundo as técnicas rotineiramente em uso no laboratório de Citogenética Humana do Serviço de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto (VARELLA-GARCIA e TAJARA, 1991). No experimento I foram montados oito frascos de cultura por paciente e por controle e no experimento II foram montados 6 frascos por paciente e por controle. Cada frasco continha aproximadamente 0,5 ml de plasma, 4,5 ml de meio de cultura RPMI 1640 (CULTILAB) suplementado com 20% de soro fetal bovino (CULTILAB), penicilina, estreptomicina e 0,2 ml de fito-hemaglutinina (GIBCO). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 71 horas e trinta minutos. Após este prazo, adicionou-se 0,1 ml de solução de colchicina Houde (Lab. Pierre-Docta S. A.) em concentração final de 4×10^{-5} M em cada réplica. Decorridos 30 minutos realizou-se a hipotonização e a fixação do material, respectivamente com KCL a 0,075 M e metanol acético (3:1). A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas e secas ao ar. De cada réplica preparam-se cinco lâminas. No experimento I, em 2 dos 8 frascos foi introduzida 0,1 ml de solução de bleomicina (Blenoxane,BRISTOL) de 150 µg/ml, 5 horas antes da colheita da cultura, o que deu a concentração final do composto na cultura de 3 U/ml (equivalente a 3 µg/ml). A mesma concentração foi utilizada por HSU **et al.** (1989) e SCHANTZ **et al.** (1990). HSU **et al.** (1989) mostraram como preparar a BLM, no entanto, cita a concentração final com um erro de cálculo, ou seja, refere 30 µg/ml quando na verdade o correto é 3 µg/ml. Em outros 2 frascos foram adicionados 5 µl de solução a 1700 µg/ml de mitomicina C (Sigma), 6 horas antes da colheita, o que resultou na concentração final de 1,7 µg/ml. Em outros dois frascos foram adicionados 200 µl de solução a 2000 µg/ml de 5-bromodesoxiuridina (Sigma) (SOUZA, 1984), 6 horas antes da colheita, o que resultou na concentração final de 80 µg/ml. Os dois frascos restantes não receberam qualquer tratamento com a gente químico, sendo usados para a pesquisa da frequência de anomalias espontâneas.

Todas as lâminas produzidas no experimento I foram submetidas a técnica de coloração usual por Giemsa. Inicialmente, o material foi hidrolizado em HCL 1N, a 60°C, por sete minutos. A seguir, foi lavado rapidamente em água deionizada gelada, e em água destilada corrente por dez minutos. Posteriormente, foi submetido a banho de 2 minutos em solução

tampão Sorensen pH 6,8, mergulhado em solução tamponada a 2% de Giemsa (MERCK) por cerca de 6 minutos e lavado em água destilada.

No experimento II, dois dos frascos foram irradiados com duas doses de 75 cGy de raios X, com intervalo de 60 minutos, no Instituto de Radioterapia de São José do Rio Preto, após 24 horas de cultivo. A esses frascos foi acrescentado 5-BrdU na concentração final de 6,0 x 10^{-3} M, para identificação posteriormente das metáfases em primeiro ciclo de divisão. Em outros dois frascos foram introduzidos, 5 horas antes da colheita da cultura, 0,1 ml de uma solução de bleomicina (BRISTOL) de 150 µg/ml, dando a concentração final de bleomicina na cultura de 3 µg/ml, como no experimento anterior. Os dois frascos restantes não receberam tratamento com agente mutagênico, sendo utilizados para a pesquisa da frequência de anomalias espontâneas.

O material cultivado em presença da 5-BrdU foi submetido à técnica FPG (Fluorescência + Giemsa) para coloração diferencial entre cromátides-irmãs, segundo KOREMBERG e FREEDLENDER (1974), com algumas modificações. Essa técnica permite a diferenciação das células que estão em primeiro, segundo ou terceiro ciclo de divisão celular. As células que estão no primeiro ciclo celular apresentam as duas cromátides fortemente coradas, as que estão no segundo ciclo celular apresentam uma cromátide mais fortemente e outra mais fracamente corada ou apresentam ambos os segmentos mais ou menos intensamente corados intercalados e as células que estão no terceiro ciclo de divisão celular apresentam regiões com ambas as cromátides irmãs fracamente coradas. Inicialmente, cada lÂmina foi coberta com um filme de bisbenzimide (Hoechst 33258, Sigma) em solução fisiológica de Hanks a 0,5% com concentração final de 0,05 µg/ml e submetida à luz UV (Philips UV, 15 W), a uma distância de 12 cm por 12 minutos. Em uma segunda etapa, cerca de 3 a 7 dias após a fixação do material, as lâminas foram incubadas em tampão fosfato NaH^2PO^4 1M (pH 8,1 a 8,3) a 87-89°C, por um tempo variando de 15 a 45 segundos, conforme o período decorrido após a fixação. Em seguida, foram lavadas em água destilada, coradas em solução a 2% de Giemsa por 5 minutos e novamente lavadas em água destilada.

A análise cromossômica, nas lâminas submetidas a este tratamento, foi realizada em células que apresentam ambas as cromátides fortemente coradas, isto é, que estavam no primeiro ciclo de divisão após o tratamento. As lâminas das outras réplicas foram submetidas À técnica de coloração usual por Giemsa a 2%.



No experimento I foram analisadas, em teste cego, 100 metáfases provenientes dos frascos não tratados dos pacientes e controles e 50 metáfases provenientes dos frascos tratados com os agentes mutagênicos.

No experimento II foram analisadas, também em teste cego, 50 metáfases provenientes dos frascos tratados com BLM e raios X e dos frascos nao tratados dos pacientes e controles, com exceção de um paciente, do qual analisou-se 100 metáfases. Foram escolhidas metáfases tecnicamente boas para análise, ou seja, sem grau acentuado de contração cromossômica e sem superposições, com número diplóide normal.

Em cada metáfase foi pesquisada a ocorrência de anomalias cromossômicas estruturais tais como do tipo quebra ou falha, cromossômicas e cromatídicas, dicêntricos, fragmentos acêntricos, anéis, marcadores, entre outras.

Nas metáfases em que ocorreram alterações, foram identificados os grupos cromossômicos envolvidos, e o tipo de anomalia encontrada. Os eventos anômalos foram classificados de acordo com as regras do ISCN (1978, 1985). As descontinuidades com desalinhamento e com o segmento cromossômico separado do restante por uma distância superior a largura da cromátide foram consideradas quebras, as descontinuidades sem desalinhamento ou com desalinhamento mínimo dos segmentos, e sem ultrapassar a distância equivalente a largura da cromátide, foram consideradas falhas. As quebras e as falhas foram consideradas cromatídicas quando afetavam apenas uma das cromátides, e cromossômicas, quando ambas as cromátides eram afetadas.

Os eventos anômalos encontrados foram fotografados para documentação ou melhor esclarecimento em microscópio Carl Zeiss modelo WL, com equipamento fotográfico MC 36, usando-se filtro de interferência verde (Carl Zeiss ref. 467806). Utilizou-se filme Ilford PAN F 50 ASA, revelado em solução Kodak D-72 por 2 minutos e meio. Os negativos foram copiados em papel fotográfico Kodabrome F2 ou F3 (Kodak).

C. Análise estatística

A organização dos dados e tabelas foi realizada pelo software SAS (Statistical Analyses System) através de procedimentos específicos. Inicialmente foi feita a análise descritiva e exploratória de dados. As frequências de anomalias cromossômicas no experimento I foram, então, submetidas a transformação arco-seno da raiz quadrada, para tornar os dados

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

homocedásticos. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar a existência de efeito do tratamento químico dentro das amostras de pacientes e controles e os intervalos de 95% de confiança foram calculados com base no desvio padrão ponderado. No experimento I utilizou-se o teste Z (distribuição assintótica normal) para verificar a existência de diferenças entre as amostras para cada grupo experimental. O teste Z também foi usado para comparação das frequências de quebras e de falhas nas amostras C e P e o teste de qui-quadrado para comparar a distribuição desses eventos nas duas amostras. Foi feita, ainda, a análise de correlação (correlação linear r de Pearson) entre as frequências de anomalias cromossômicas dos indivíduos controles e dos pacientes com NF, sendo sua significância testada pelo teste t de Student. Tais testes estatísticos foram aplicados de acordo com COSTA NETO (1977) e BOX **et al.** (1978).

No experimento II, os dados revelaram heterocedasticidade e a transfomação arco seno raiz quadrada da proporção não estabilizou as variâncias. Por isso, utilizou-se um teste não paramétrico mais indicado para os dados, o teste de Kruskall-Wallis (HOLANDER e WOLFE, 1973), para comparação dentro e entre os grupos experimentais e amostras. Utilizou-se, também, o teste qui-quadrado para comparar as distribuições dos eventos anômalos nas duas amostras.

III. RESULTADOS

III.1. Avaliação Genético-Clínica

A Tabela 4 mostra os 67 pacientes avaliados, pertencentes a 43 famílias e a caracterização de cada paciente. As famílias estão identificadas por números e os indivíduos por duas letras, correspondentes as suas iniciais. Nesta tabela são apresentadas informacões sobre a idade, sexo, grupo étnico, profissão, escolaridade, estatura, peso, perímetro cefálico, existência ou não de recorrência da NF a idade de início das manifestações da NF. Na Tabela 5 essas variáveis são resumidas em relação a amostra. Os heredogramas de todas as famílias que apresentaram recorrência da NF são mostrados nas Figuras de número 6 a 27, na mesma sequência que as famílias são apresentadas na Tabela 4. Todos os heredogramas foram compatíveis com padrão de herança autossômico dominante.

A idade dos pacientes variou de 2 a 61 anos, com média e desvio padrão de 31,0 ± 16,8. Dos 67 pacientes, 39(58%) eram do sexo feminino e 28(42%) eram do sexo masculino. Foram analisados 38 indivíduos caucasóides (56,7%) e 29 negróides (43,3%). Em relação ao nível de escolaridade, 40 pacientes (59,7%) não concluiram o primeiro grau, três (4,5%) pacientes concluiram o primeiro grau, um (1,5%) paciente não concluiu o segundo grau, quatro (5,9%) pacientes terminaram o segundo grau, um (1,5%) fez curso superior, três (4,5%) frequentaram escola de educação especial (APAE), e sete (10,4%) nunca frequentaram escola. Em 8 casos (12,0%), a variável não foi pesquisada.

A partir das frequências de algumas características antropométricas investigadas, pode-se observar que a maioria dos pacientes apresentou estatura abaixo da média populacional, ou seja, 57,5% dos pacientes com NF apresentaram estatura abaixo do percentil 10 sendo que 44,5% estavam abaixo do percentil 3. Cerca de 83% dos indivíduos estudados apresentavam perímetro cefálico acima do percentil 50 e, destes, 46,1% estavam entre os percentis 50 e 98, 17,3% no percentil 98 e 19,3% acima do percentil 98. As informações sobre recorrência familial e início da manifestação dos sinais da NF são resumidas na Tabela 5. Houve recorrência em 46 indivíduos de 22 famílias (51,2%), e a condição ocorreu no paciente como caso único em sua família em 21 casos (48,8%). Os primeiros sinais da NF manifestaram-se em 33 pacientes (50,0%) na primeira década de vida, em 19 pacientes (28,7%) na segunda década de vida, em 10 (15,2%) na terceira década e em apenas 4 (6,1%) na quarta década de vida.



A caracterização dos pacientes em relação aos principais sinais clínicos investigados e o enquadramento nos tipos de NF proposto por RICCARDI (1982) são apresentados na Tabela 6, e alguns dos sinais clínicos são ilustrados nas Figuras 2, 3, e de 28 a 46. Considerou-se como características principais, ou mais frequentes, as manchas café-com leite (MCCL), os neurofibromas, as sardas axilares, os nódulos de Lisch e outras manifestações oculares, as alterações ósseas, o retardo mental e outras alterações psicológicas, e as alterações de eletroencefalograma e eletrocardiograma. Dos 67 indivíduos estudados, 60 indivíduos de 38 famílias (89,6%) foram classificados no tipo NF1, um indivíduo (1,5%) foi enquadrado no tipo NF3 (misto), dois indivíduos de duas famílias (3%) foram classificados no tipo NF5 (segmentar), três indivíduos de uma família (4,4%) foram classificados no tipo NF6 (MCCL familial) e um indivíduo (1,5%) foi enquadrado no tipo NF7 (início tardio). Para tal classificação foram consideradas todas as avaliações realizadas no presente estudo, apresentadas a seguir.

A Tabela 7 mostra a frequência dos principais sinais clínicos observados no presente estudo e a Figura 44 mostra graficamente as frequências desses sinais. As MCCL foram observadas em 98,5% e outras alterações psicológicas, além do retardo mental, foram observadas em todos os pacientes pesquisados. Os neurofibromas, sardas axilares e outras alterações oculares apareceram na frequência de 84,6% a 86,5%. As alterações ósseas e os nódulos de Lisch foram observados em 70% a 75% dos pacientes. O retardo mental foi observado em cerca de 40%, as alterações eletrocardiográficas em 30% e as eletroencefalográficas em 13%.

Os neurofibromas do tipo plexiforme foram observados em 14 pacientes (21 %), conforme mostra a Tabela 6. Em sete deles ocorreram apenas neurofibromas do tipo plexiforme e nos outros sete ocorreram ambos, neurofibromas isolados e neurofibromas do tipo plexiforme. Tais tumores apresentaram hiperpigmentação em toda sua extensão em nove dos 14 casos (64,3%), e em cinco casos (35,7%) não foi observada hiperpigmentação sobre o neurofibroma plexiforme (35,7%).

A frequência e localização dos sinais MCCL, neurofibromas, sardas axilares e nódulos de Lisch são apresentadas na Tabela 8. Para definição da frequência com que os sinais apareciam (MCCL e neurofibromas), utilizou-se as categoria frequência "baixa" (quando o número daquele sinal particular era facilmente contado e eles apareciam em número menor do que 50), frequência "média" (quando houve certa dificuldade para contar o número de sinais, sendo que eles apareciam em frequências variáveis entre 51 e 150) e frequência "alta" (acima de

150). Para caracterização da frequência de sardas axilares utilizou-se frequência "baixa" para os indivíduos com até quatro sardas, frequência "média" para os indivíduos com até oito sardas e frequência "alta" para os com mais de oito sardas axilares. Os nódulos de Lisch foram considerados com frequência "baixa" quando apareciam em número de até três, frequência "média" com até seis e "alta" com número maior que seis. A localização de um sinal foi considerada "difusa" quando a característica foi observada em mais do que três diferentes partes do corpo.

A Tabela 9 mostra a casuística, dividida em indivíduos com menos de 18 anos e acima de 18 anos, em relação as frequências das diferentes categorias nas quais os sinais MCCL, neurofibromas, sardas axilares e nódulos de Lisch foram enquadrados. As MCCL foram observadas com frequência "baixa" em 47,1% dos indivíduos até 17 anos de idade e em 38,7% dos indivíduos com 18 anos de idade ou mais; com frequência "alta" em 17,6% dos casos até 17 anos e em 32,7% dos casos com 18 anos ou mais. As sardas axilares foram observadas em 43% e 50% dos casos de um a 17 anos com frequências "baixa e média", respectivamente; 39% e 51,2% nos casos com 18 anos ou mais, com frequências "média e alta", respectivamente. Os neurofibromas foram detectados com frequência "baixa" em 91% dos indivíduos até 17 anos, nos indivíduos com 18 anos ou mais, foram observados com frequência "baixa" em 42% e com frequências "média e alta" em 29%. Tais achados são compatíveis com o esperado, pois a NF apresenta desenvolvimento progressivo com a idade. Os nódulos de Lisch foram observados com frequência "baixa" em 45,4% dos indivíduos até 17 anos e em 27,3%, respectivamente com frequências "média e alta". Nos indivíduos com 18 anos ou mais, foram observados com frequências "baixa e média" em 35,7%, respectivamente e com frequência "alta" em 28,6%.

As MCCL apresentaram localização difusa em 51 pacientes (76%) e localizadas em pelo menos três partes do corpo em 16 casos (24%). Os neurofibromas foram observados com localização difusa em 38 pacientes (57%), com localização em cerca de três partes do corpo em 21 casos (31%) e oito pacientes (12%) não apresentaram neurofibromas.

As sardas axilares foram observadas em todos os 67 casos bilateralmente, e os nódulos de Lisch foram bilaterais em 35 pacientes (61,4%), unilaterais em 7 pacientes (12,3%; 4 em olho direito e 3 em olho esquerdo) e ausentes em 15 (26,3%), de um total de 57 casos investigados. Dos que manifestaram nódulos de Lisch unilaterais, apenas um paciente (caso 22-RB) era criança, os demais eram adultos, um deles apresentando NF segmentar com manifestações apenas no hemicorpo direito (caso 21-GE).

unesp

A Tabela 10 mostra os resultados das avaliações psicológicas em 30, dos 67 pacientes com NF. Foram consideradas as variáveis QI, disfunções neurológicas, depressão, ansiedade e deficit perceptivo motor. A Tabela 11 mostra a situação da casuística em relação a classificação dessas variáveis. Observa-se que 43,3% dos pacientes tem RM moderado ou leve, QI limítrofe (20,0%) e médio inferior (23,4%),e apenas 13,3% tem QI médio. A grande maioria dos pacientes apresentou déficit perspectivo motor (DPM - 97%) e indícios de comprometimento neurológico (ICN- 77%). Apenas 10,7% dos pacientes não apresentaram depressão, um único paciente apresentou distimia, ou seja, sinais momentâneos do distúrbio, e a grande maioria dos pacientes (86%) apresentou a depressão maior (DM), classificada em leve, moderada e severa (Tabela 11). A ansiedade transitória esteve presente em 90% da amostra, em grau leve, moderado (mais comum) ou alto. A ansiedade estável foi detectada em 83,3% da amostra, e 53,3% dos pacientes a apresentaram no grau alto. Apenas dois pacientes (6,7%) não apresentaram sinais de distúrbio de déficit de atenção por hiperatividade (DDAH), os demais (93,3%) os apresentaram, com sinais que variaram de 1 a 11.

As avaliações radiológicas de 53 pacientes (79% do total), sendo que 40 pacientes (76% dos submetidos a avaliação) apresentaram alterações e 13 pacientes (24%) não mostraram qualquer alteração. A Tabela 12 mostra os achados radiológicos, a frequência de cada alteração e o número de algumas figuras que ilustram esses achados. As alterações mais frequentes foram escoliose, que apareceu como característica única em 28,3% dos casos com alterações, e escoliose associada com cifose, ou seja, cifoescoliose, encontrada em 17% dos pacientes com alterações. Foram observados também peito escavado (11,3%), alargamento de foramen (11,3%) e atraso de maturação óssea (9,4%). Outras alterações menos frequentes foram espinha bífida (5,7%), alargamento do mediastino (5,7%), geno valgo (3,8%), periostite (5,7%), fusão de vértebras cervicais (5,7%), alterações da morfologia vertebral (3,8%), vértebra de transição lombosacral (7,5%), fibroma cortical (7,5%) e sela turca em "J" (1,9%).

A investigação das alterações oculares, excluídos os nódulos de Lisch, é apresentada na Tabela 13. Denominou-se "outras", na Tabela 13, as alterações menos frequentes como gliose peripapilar (1-VR), papilas com escavação (3-AP), área de atrofia em arcada superior do olho direito (12-MN), atrofia óptica (13-MC), papila com implantanção oblíqua (16 IS, 23-MU e 29-IM), íris hiperplásica (18-MA), retinite pigmentar associada com mácula sem brilho e papila atrófica (19-MP), papilas aumentadas (20-AB), obstrução do canal lacrimal (22-RB), distrofia corneana associada com mácula com aspecto degenerativo (29-IM), grande cicatriz na retina

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

(35-MG), retificação de vasos (36-RO), íris com rarefação muscular (39-MB) e atrofia de íris (42-RS).

A Tabela 14 mostra as frequências das alterações oculares. As características mais frequentes foram diminuição da acuidade visual (60%), hipermetropia (27%), astigmatismo (33%), miopia (21%), pterígio (19%), neurofibroma em palpebra (15%) e estrabismo (11,5%). Com frequências de 5,7% a 7,7%, foram observados glaucoma, catarata, coroidose e lesões em retina sugestivas de neurofibromas.

A avaliação eletrocardiográfica foi realizada em 43 pacientes com NF. Observou-se alterações em 30% desses. A Tabela 15 mostra tais alterações e suas frequências. Observa-se que extra-sístole ventricular e taquicardia sinusal apareceram em 7% e 11,6% dos pacientes, respectivamente. Tais alterações não são consideradas patológicas quando aparecem isoladamente em indivíduos normais, e são encontradas na população geral com frequência de cerca de 1%. As demais alterações mostradas na Tabela 15 podem ser consideradas patológicas e foram observadas nos pacientes com NF na frequência de 2,3%.

A avaliação eletroencefalográfica foi realizada em 53 pacientes com NF, dos quais sete (13%) exibiram alterações. Foram observados dois tipos de alterações: anormalidade paroxística no hemisfério cerebral esquerdo em quatro pacientes (7,5% - casos 3-AP, 5-EB, 30-AV e 40-TG) e lentificação difusa da atividade cerebral em três pacientes (5,7% - casos 16-ZS, 22-RB e 29-ML).

Outras características menos frequentemente observadas em pacientes com NF foram também avaliadas no presente estudo, e os dados são apresentados na Tabela 16. Seis pacientes (9%) apresentavam convulsões controladas por medicamentos anticonvulsivantes e apenas um deles (caso 30-AV) apresentou alteração em eletroencefalograma. A hiperglicemia foi observada em 7,4% dos casos, com taxas variando de 115 mg/dl a 210 mg/dl (normal = 50 a 100 mg/dl). A cefaléia, disartria, constipação intestinal, hemorróida e problemas ginecológicos foram observados em 7,4% dos casos. As infecçõoes de repetição de vias aéreas e pneumonias, ptose palpebral, hipertensão arterial, problemas gástricos e constipação intestinal foram observados em 6% dos casos. A referência de associação do aumento das característica de NF com a gravidez ocorreu em três pacientes do sexo feminino que tiveram filhos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela 4. Dados pessoais, familiais e antropométricos da amostra analisada.

Família	Indivíduo	Idade	Sexo	Grupo étnico	Profissão	Escolaridade	Estatura (m)	Peso (kg)	PC (cm)	Recorrência	Início/sinais NF (anos)
1	JR	39	F	C	lavradora	1	1,62	60,0	58	+	18
	VR	11	F	N	estudante	1	1,38	33,0	55	+	6
2	BS	35	F	N	do lar	1	1,48	54,8	56	+	15
	CS	16	M	N	vendedor	1	1,53	46,0	56	+	2
	LS	15	M	N	estudante	1	1,48	39,8	56	+	3
3	AP	38	M	C	motorista	1	1,58	46,5	57	+	7
	VM	03	M	C	-	-	0,89	12,7	53	+	2
4	GP	12	M	C	estudante	1	1,44	35,5	56	-	3
5	EB	58	F	N	do lar	-	1,42	63,8	58	-	20
6	AM	52	M	N	func.publ.	4	1,70	57,0	57	+	13
7	LT	50	F	C	do lar	1	?	?	?	-	?
8	LC	09	M	N	estudante	1	?	?	?	-	4
9	IT	49	F	C	do lar	1	1,61	64,0	58	-	17
10	MV	56	F	N	do lar	1	1,54	54,0	56	+	26
	AP	36	M	N	lavrador	?	?	?	?	+	22
	PP	31	M	N	lavrador	?	?	?	?	+	30
	RP	30	F	N	do lar	?	1,55	53,0	56	+	20
11	EA	09	M	C	estudante	1	?	?	?	-	3
12	MN	21	F	N	do lar	1	?	?	?	+	7
13	MC	50	M	C	vendedor	1	1,56	58,0	59	+	19
14	SA	23	F	N	do lar	1	1,58	57,0	56	+	21
15	JP	59	M	C	lavrador	-	1,58	56,0	57	-	18
16	BS	34	M	N	lavrador	1	1,62	64,0	61	+	6
	AS	32	M	N	guarda not.	1	1,60	53,8	56	+	7
	IS	29	F	N	emp.domest.	1	1,33	46,3	56	+	7
	ZS	23	F	N	emp.domest.	1	1,47	54,3	55	+	7
17	MS	49	F	C	do lar	1	1,55	50,5	57	+	15
	FS	19	F	C	estudante	4	1,55	58,0	58	+	12
18	MA	34	F	C	do lar	4	1,56	52,0	55	+	1
	MF	32	F	C	bancária	4	?	?	?	+	1
	RF	02	F	C	-	-	0,82	10,2	49	+	1
19	MP	50	F	C	do lar	?	?	?	?	+	15
	JR	24	M	C	mecânico	1	1,56	51,4	56	+	16
20	AB	43	F	C	do lar	1	1,53	41,0	58	-	18
21	GE	25	F	C	do lar	2	1,56	62,5	58	-	1
22	RB	09	M	C	-	6	1,24	27,0	53	-	7
23	MU	41	F	C	do lar	1	1,56	67,2	60	-	2
24	LB	59	F	C	do lar	1	1,47	50,3	58	-	14
25	EF	31	M	C	func.publ.	1	1,76	82,6	57	-	20
26	JS	05	M	C	-	-	1,09	17,7	54	-	4
27	MT	43	M	C	comerciante	5	1,74	79,0	?	-	27
28	MJ	31	F	N	do lar	1	1,58	63,0	60	+	15
	FJ	07	F	N	-	-	?	?	?	+	2
29	IM	54	F	C	do lar	1	?	?	?	+	30
	VM	36	F	C	emp.domest.	?	?	?	?	+	27
	JM	28	F	C	do lar	?	?	?	?	+	26
	MM	26	F	C	do lar	?	?	?	?	+	22

+ = presença; - = ausência; ? = não investigado; PC = perímetro cefálico; m = metros; kg = quilogramas; cm = centímetros; F = feminino; M = masculino; C = caucasóide; N = negróide; 1 = curso de primeiro grau incompleto; 2 = curso de primeiro grau completo; 3 = curso de segundo grau incompleto; 4 = curso de segundo grau completo; 5 = curso superior; 6 = educação especial.



Tabela 4. continuação

Família	Indivíduo	Idade	Sexo	Grupo étnico	Profissão	Escolaridade	Estatura (m)	Peso (kg)	PC (cm)	Recorrência	Início/ sinais NF (anos)
30	AV	26	M	C	mecânico	1	1,80	58,0	54	-	15
31	WM	56	M	C	vendedor	2	1,73	82,2	56	+	40
32	FR	53	F	N	vendedora	1	1,17	29,6	56	+	5
	ER	19	M	N	eletricista	3	1,54	52,3	55	+	7
33	RF	09	M	C	estudante	1	1,32	31,0	60	-	3
34	CB	32	M	C	lavrador	1	1,58	57,0	56	+	7
35	MG	61	F	C	do lar	1	1,60	72,9	56	-	35
36	RO	52	F	N	do lar	1	1,50	58,0	59	+	10
	MO	30	F	N	do lar	1	1,45	38,0	53	+	10
37	DP	07	M	C	-	-	0,97	16,0	53	-	4
38	LP	57	F	C	do lar	1	1,52	49,0	57	+	40
	GP	28	M	C	mecânico	1	1,54	52,0	56	+	26
39	MB	39	F	N	do lar	1	1,65	44,0	56	+	15
40	TG	08	M	N	estudante	6	1,27	23,0	57	-	1
41	AR	36	F	N	do lar	2	1,47	45,4	56	+	10
	OR	33	F	N	do lar	1	1,42	37,0	55	+	9
	SG	14	F	N	estudante	1	1,60	45,9	55	+	11
42	CP	32	F	C	do lar	?	1,58	55,0	56	+	32
	RS	08	M	C	estudante	6	1,08	15,4	?	+	3
43	CA	10	F	N	estudante	1	1,25	24,6	53	-	5

+ = presença; - = ausência; ? = não investigado; PC = perímetro cefálico; m = metros; kg = quilogramas; cm = centímetros; F = feminino; M = masculino; C = caucasóide; N = negróide; 1 = curso de primeiro grau incompleto; 2 = curso de primeiro grau completo; 3 = curso de segundo grau incompleto; 4 = curso de segundo grau completo; 5 = curso superior; 6 = educação especial.

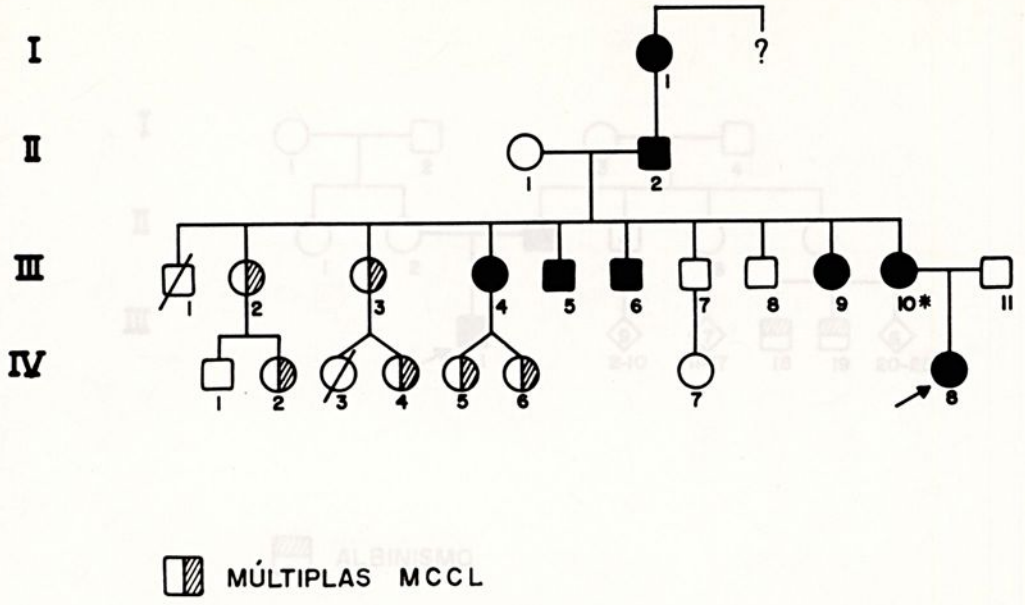


Figura 6. Heredograma da família 1, indivíduos JR (III 10) e VR (IV 8).

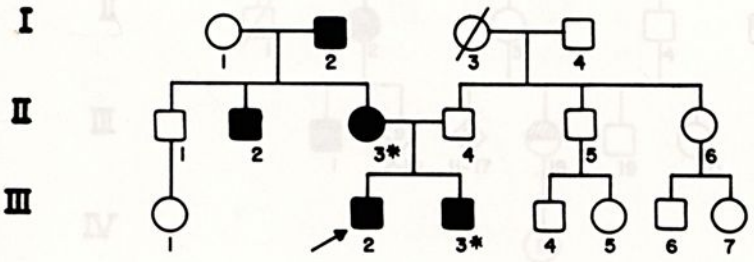


Figura 7. Heredograma da família 2, indivíduos BS (II 3), CS (III 2) e LS (III 3).

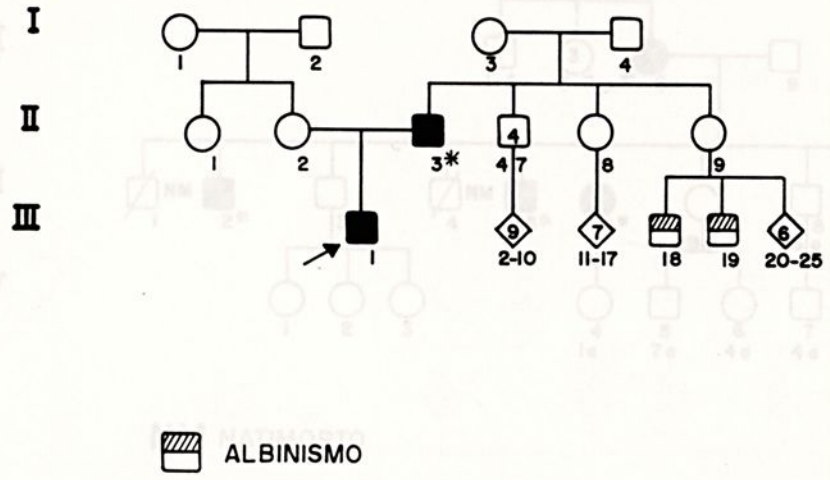


Figura 8. Heredograma da família 3, indivíduos AP (II 3) e VM (III 1).

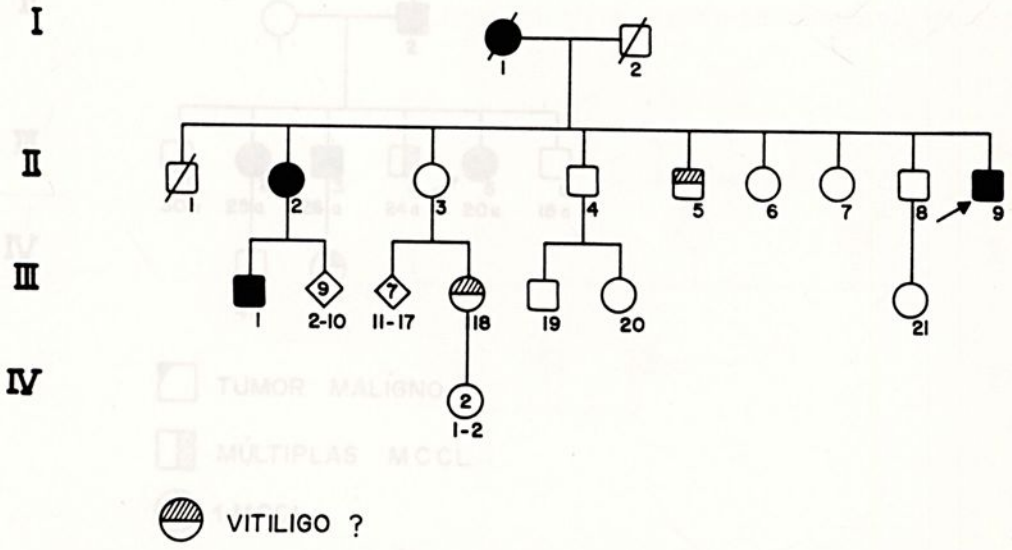


Figura 9. Heredograma da família 6, indivíduo AM (II 9).

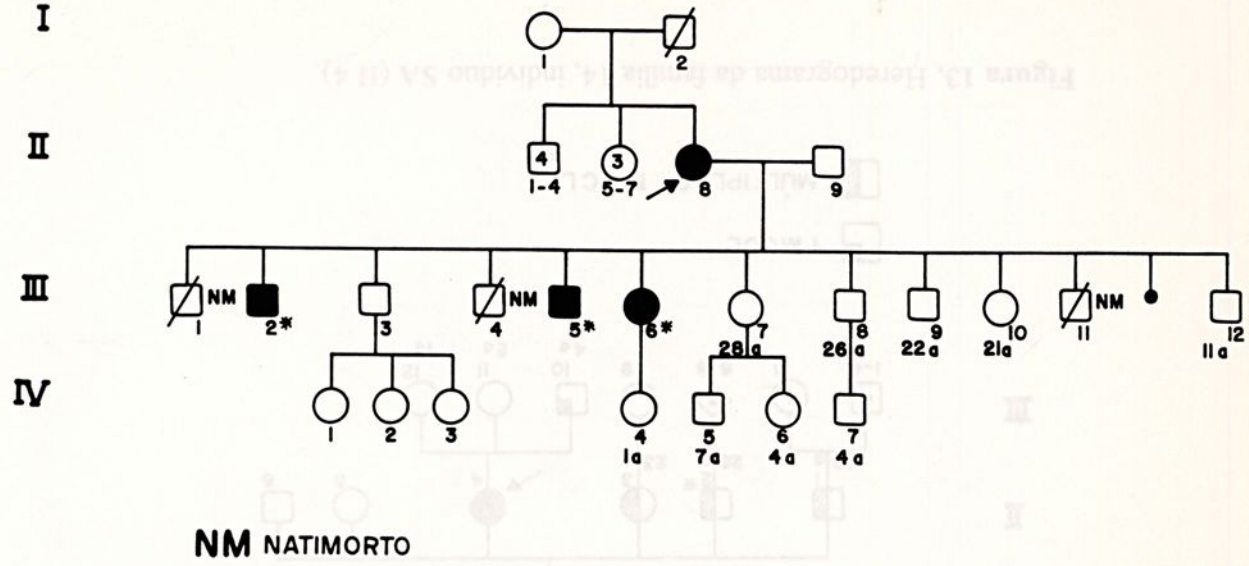


Figura 10. Heredograma da família 10, indivíduos MV (II 8), AP (III 2), PP (III 5) e RP (III 6).

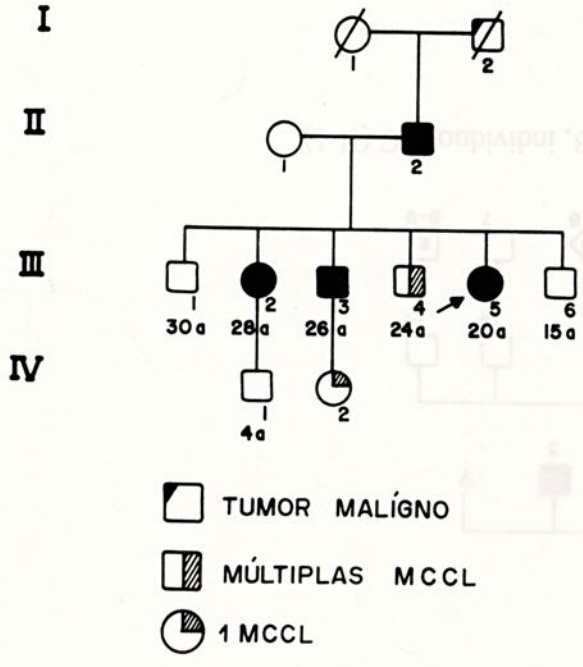


Figura 11. Heredograma da família 12, indivíduo MN (III 5)

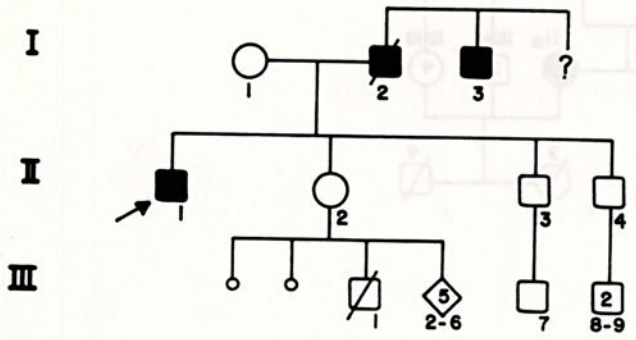


Figura 12. Heredograma da família 13, indivíduo MC (II 1).

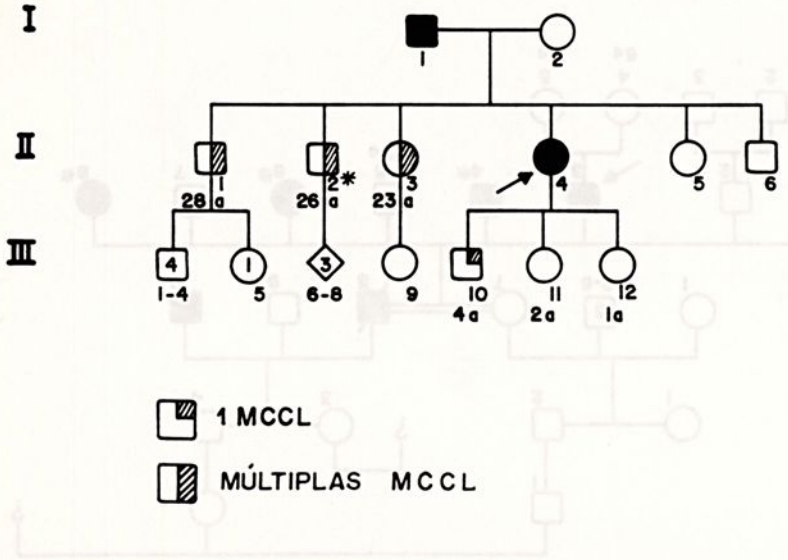


Figura 13. Heredograma da família 14, indivíduo SA (II 4).

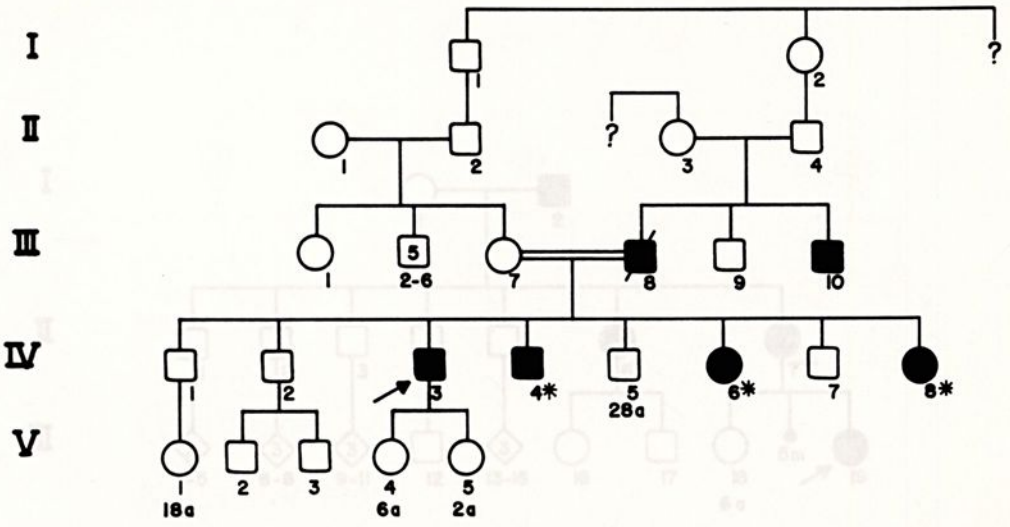


Figura 14. Heredograma da família 16, indivíduos BS (IV 3), AS (IV 4), IS (IV 6) e ZS (IV 8).

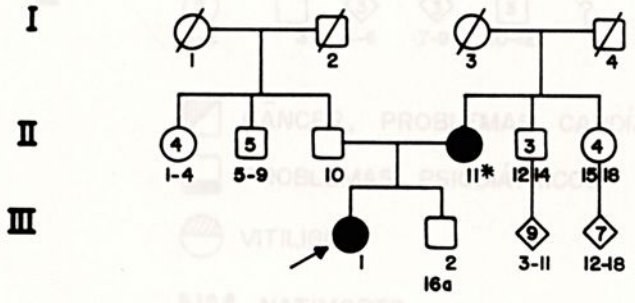


Figura 15. Heredograma da família 17, indivíduos MS (II 11) e FS (III 1).

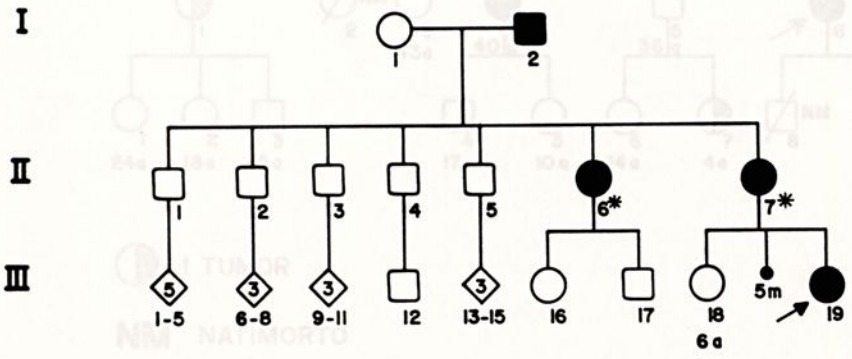


Figura 16. Heredograma da família 18, indivíduos MA (II 7), MF (II 6) e RF (III 19).

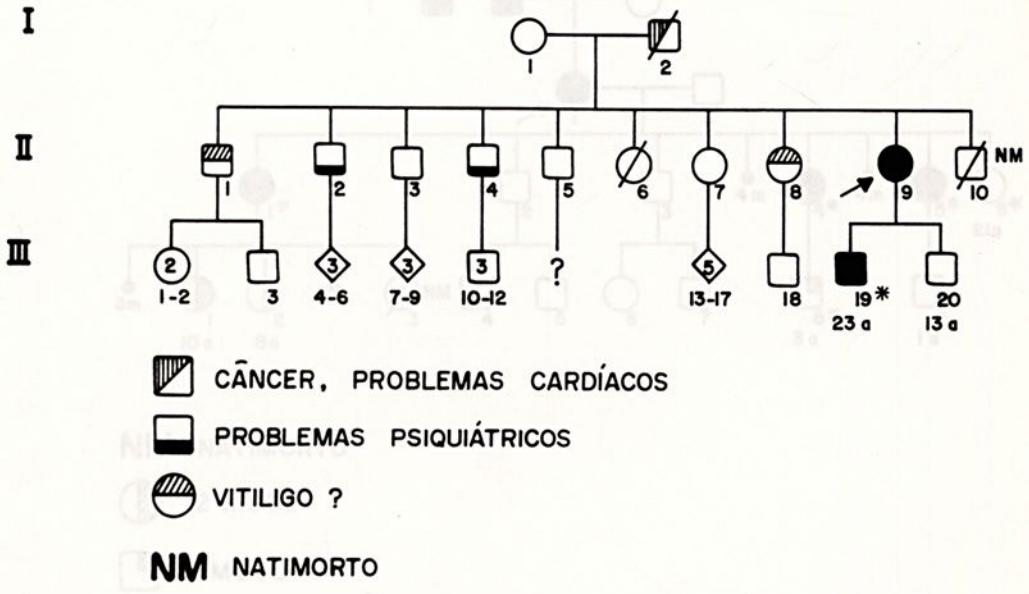


Figura 17. Heredograma da família 19, indivíduos MP (II 9) e JR (III 19).

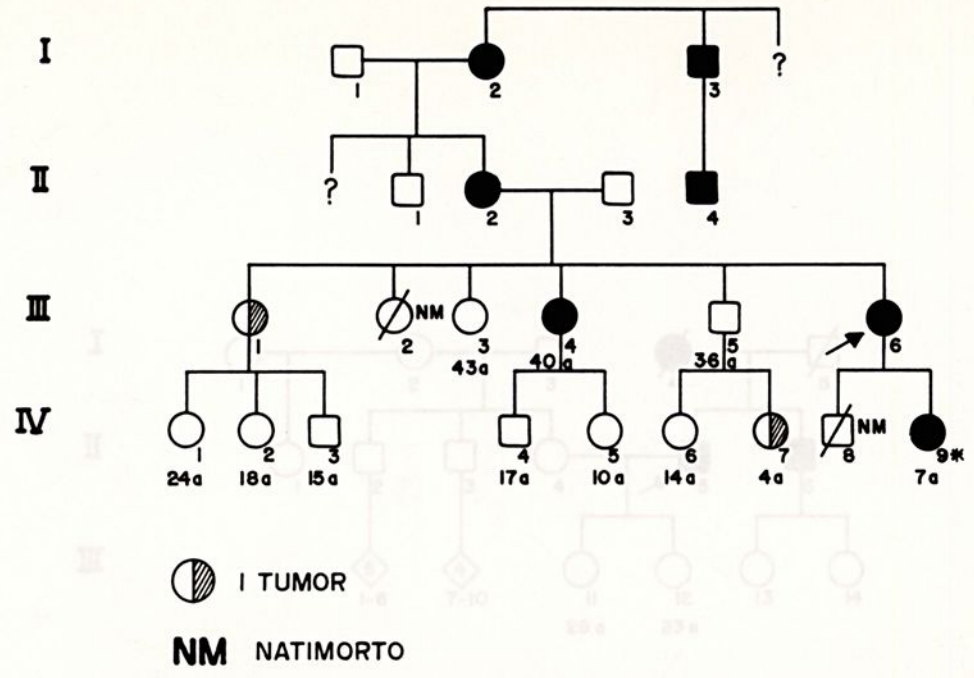


Figura 18. Heredograma da família 28, indivíduos MJ (III 6) e FJ (IV 9).

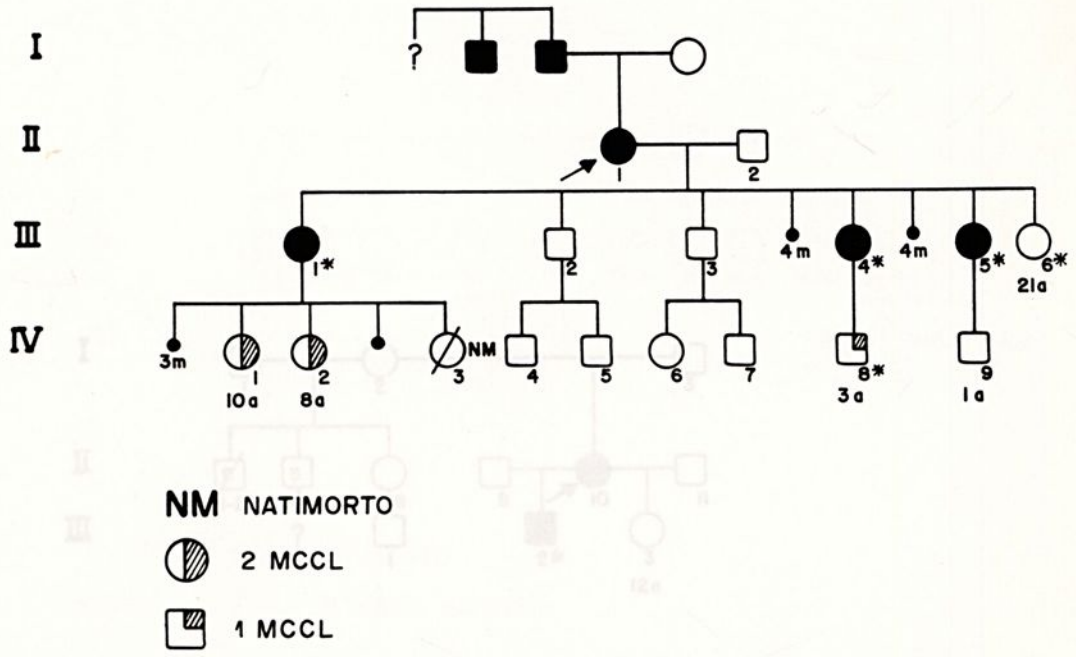


Figura 19. Heredograma da família 29, indivíduos IM(II 1), VM(III 1), JM(III 4) e MM(III 5).

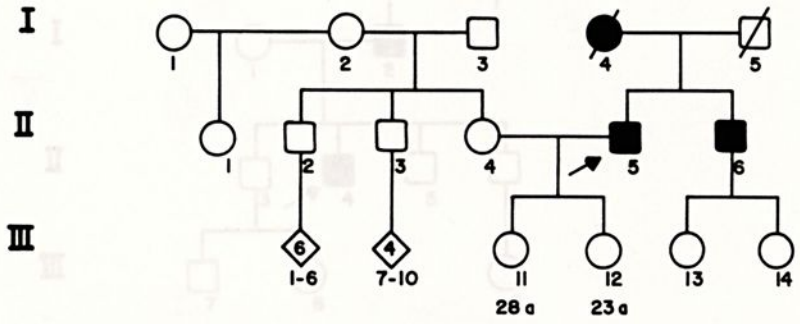


Figura 20. Heredograma da família 31, indivíduo WM (II 5).

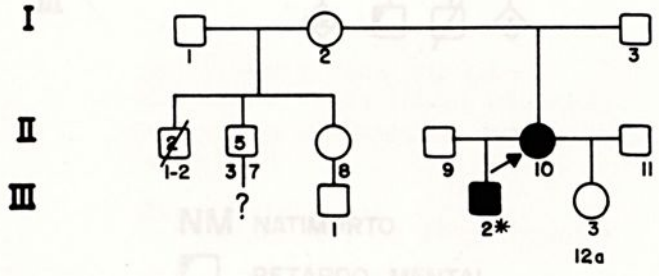


Figura 21. Heredograma da família 32, indivíduos FR (II 10) e ER (III 2).

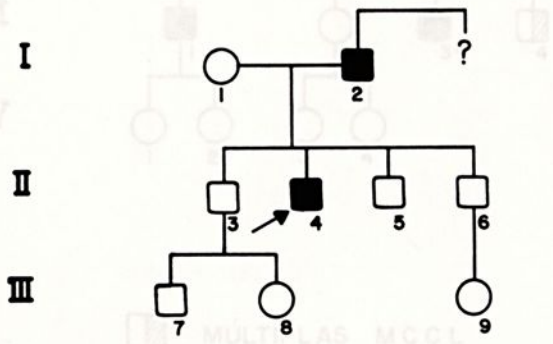


Figura 22. Heredograma da família 34, indivíduo CB (II 4).

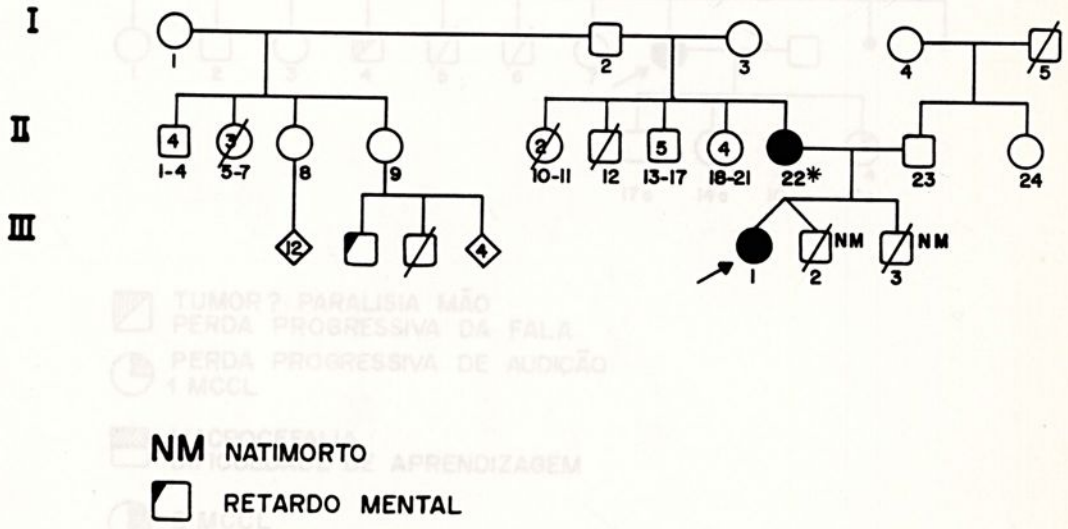


Figura 23. Heredograma da família 36, indivíduos RO (II 22) e MG (III 1).

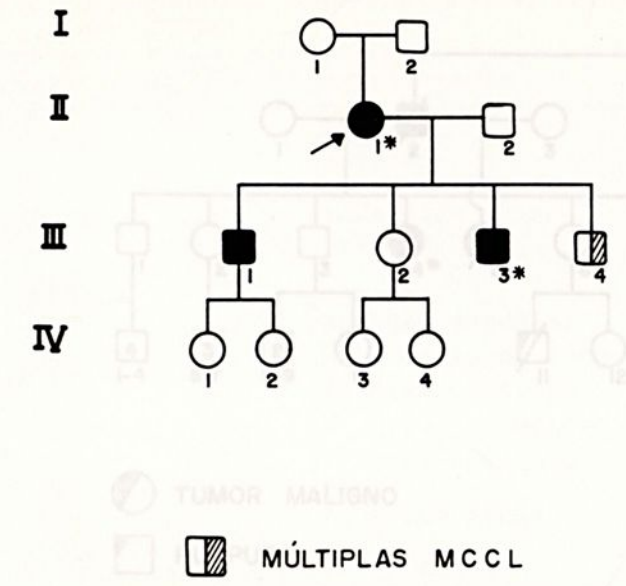


Figura 24. Heredograma da família 38, indivíduos LP (II 1) e GP (III 3).

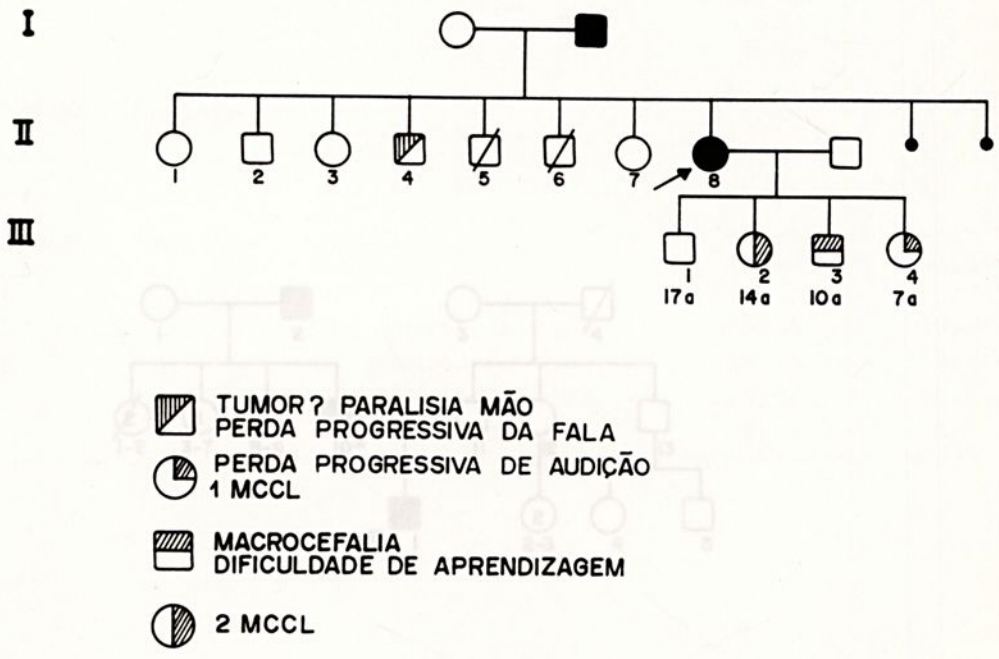


Figura 25. Heredograma da família 39, indivíduo MB (II 8).

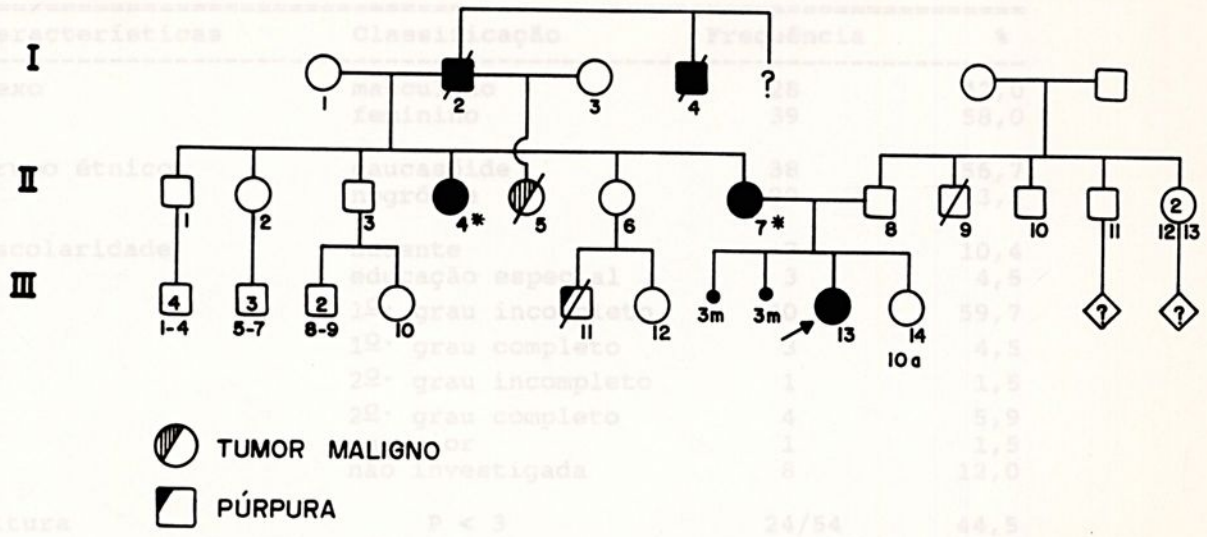


Figura 26. Heredograma da família 41, indivíduos AR (II 7), OR (II 4) e SG (III 13).

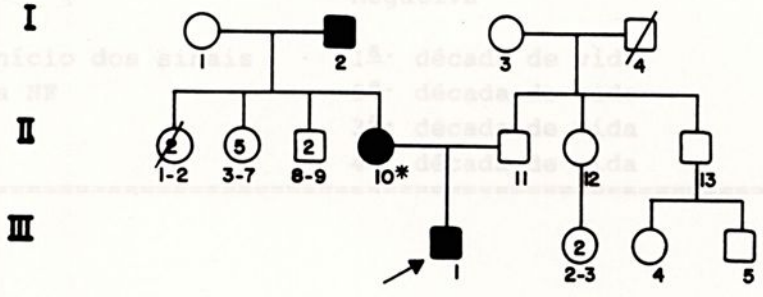


Figura 27. Heredograma da família 42, indivíduos CP (II 10) e RS (III 1).

Tabela 5. Frequências observadas das características gerais dos pacientes.

Características	Classificação	Frequência	%
Sexo	masculino	28	42,0
	feminino	39	58,0
Grupo étnico	caucasóide	38	56,7
	negróide	29	43,3
Escolaridade	ausente	7	10,4
	educação especial	3	4,5
	1º. grau incompleto	40	59,7
	1º. grau completo	3	4,5
	2º. grau incompleto	1	1,5
	2º. grau completo	4	5,9
	superior	1	1,5
	não investigada	8	12,0
Altura	P < 3	24/54	44,5
	3 < P < 10	7/54	13,0
	10 < P < 25	8/54	14,8
	25 < P < 50	10/54	18,5
	50 < P < 75	3/54	5,5
	75 < P < 90	2/54	3,7
Peso	P < 3	12/54	22,3
	3 < P < 10	8/54	14,8
	10 < P < 25	9/54	16,7
	25 < P < 50	12/54	22,3
	50 < P < 75	5/54	9,2
	75 < P < 90	8/54	14,7
Perímetro cefálico	2 < P < 50	9/52	17,3
	50 < P < 98	24/52	46,1
	P = 98	9/52	17,3
	P > 98	10/52	19,3
Recorrência familial	positiva	46/67	68,6
	negativa	21/67	31,4
Início dos sinais da NF	1ª. década de vida	33/66	50,0
	2ª. década de vida	19/66	28,7
	3ª. década de vida	10/66	15,2
	4ª. década de vida	4/66	6,1

Tabela 6. Principais sinais clínicos investigados e classificação dos tipos de NF.

Família	Indivíduo	MCCL	Neurofibroma	Sardas axil.	Nódulos Lisch	Outras alt. oculares	Alt. ósseas	RM	Outras alt. psicológ.	Alt. EEG	Alt. ECG	Classificação	Figura
1	JR	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	NF1	28
	VR	+	+plex	+	+	+	−	+	+	+	+	NF1	28
2	BS	+	+	+	+	−	?	?	?	−	−	NF1	29
	CS	+	+plex	+	+	−	+	?	?	−	+	NF1	29
	LS	+	+plex	+	+	−	+	?	?	−	+	NF1	29
3	AP	+	+plex	+	+	+	+	−	+	+	−	NF1	
	VM	+	+plex	−	−	−	−	?	?	−	−	NF1	2
4	GP	+	+plex	+	+	−	?	+	+	−	−	NF1	
5	EB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NF1	
6	AM	+	+	?	+	+	+	−	+	−	−	NF1	4
7	LT	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	NF1	
8	LC	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	NF1	
9	IT	+	+plex	−	−	+	+	+	+	−	?	NF1	
10	MV	+	+	+	?	?	?	+	+	?	−	NF1	
	AP	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	NF1	
	PP	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	NF1	
	RP	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	NF1	
11	EA	+	+	+	−	+	?	?	?	−	?	NF1	30
12	MN	+	+plex	+	+	+	+	+	+	−	−	NF1	
13	MC	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	NF1	
14	SA	+	+	+	?	?	−	?	?	−	−	NF1	
15	JP	+	+	+	+	+	+	?	?	?	?	NF1	
16	BS	+	+	+	+	−	+	−	+	−	?	NF1	
	AS	+	+plex	+	−	+	+	?	?	−	−	NF1	
	IS	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	NF1	31
	ZS	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	NF1	31
17	MS	+	+	+	+	+	+	?	?	−	−	NF1	
	FS	+	+plex	+	+	+	−	−	+	−	−	NF1	
18	MA	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	NF6	32
	MF	+	−	+	−	?	?	?	?	?	?	NF6	
	RF	+	−	+	−	−	+	?	?	−	−	NF6	32
19	MP	+	+	+	+	+	−	?	?	?	?	NF1	
	JR	+	+	+	?	?	+	?	?	?	?	NF1	
20	AB	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	NF1	
21	GE	+	+plex	−	−	+	+	−	+	−	−	NF5	3
22	RB	+	−	+	+	+	−	?	?	+	?	NF1	33
23	MU	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	NF1	34
24	LB	+	+	+	−	+	+	?	?	−	−	NF3	35
25	EF	+	+	−	+	−	+	?	?	−	?	NF1	
26	JS	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	NF1	
27	MT	+	+plex	−	−	?	+	?	?	?	?	NF5	36
28	MJ	+	+	+	+	?	?	+	+	−	?	NF1	
	FJ	+	−	+	−	?	−	?	?	−	−	NF1	
29	IM	+	+	+	+	+	?	−	+	−	?	NF1	
	VM	+	+	+	+	+	+	?	?	−	?	NF1	
	JM	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	NF1	
	MM	+	+	+	+	−	−	?	?	+	−	NF1	
30	AV	+	+	−	−	−	−	?	?	+	−	NF1	
31	WM	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	NF1	
32	FR	+	+plex	+	+	−	+	−	+	−	+	NF1	37
	ER	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	NF1	2
33	RF	+	+	+	+	−	+	−	+	−	?	NF1	38
34	CB	+	+	+	−	+	+	?	?	−	+	NF1	
35	MG	−	+	−	−	+	+	+	+	−	?	NF7	39
36	RO	+	+	+	+	+	+	?	?	−	+	NF1	40
	MO	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	NF1	40
37	DP	+	−	+	+	−	+	?	?	?	?	NF1	41
38	LP	+	+	+	+	+	+	?	?	−	+	NF1	
	GP	+	+	+	+	?	?	?	?	?	?	NF1	
39	MB	+	+	+	+	+	?	?	?	?	+	NF1	
40	TG	+	−	+	+	+	+	?	?	−	+	NF1	42
41	AR	+	+	+	+	?	+	−	+	−	+	NF1	
	OR	+	+plex	+	?	?	+	?	?	−	−	NF1	43
	SG	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	NF1	
42	CP	+	+	−	?	?	−	−	+	−	?	NF1	
	RS	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	NF1	
43	CA	+	+	+	+	+	−	?	?	−	?	NF1	

alt. = alterações; plex = plexiforme; + = presença; − = ausência; ? = não investigado; NF1 = NF clássica; NF3 = NF mista; NF5 = NF segmentar; NF6 = NF mancha café-com-leite familial; NF7 = NF de início tardio.

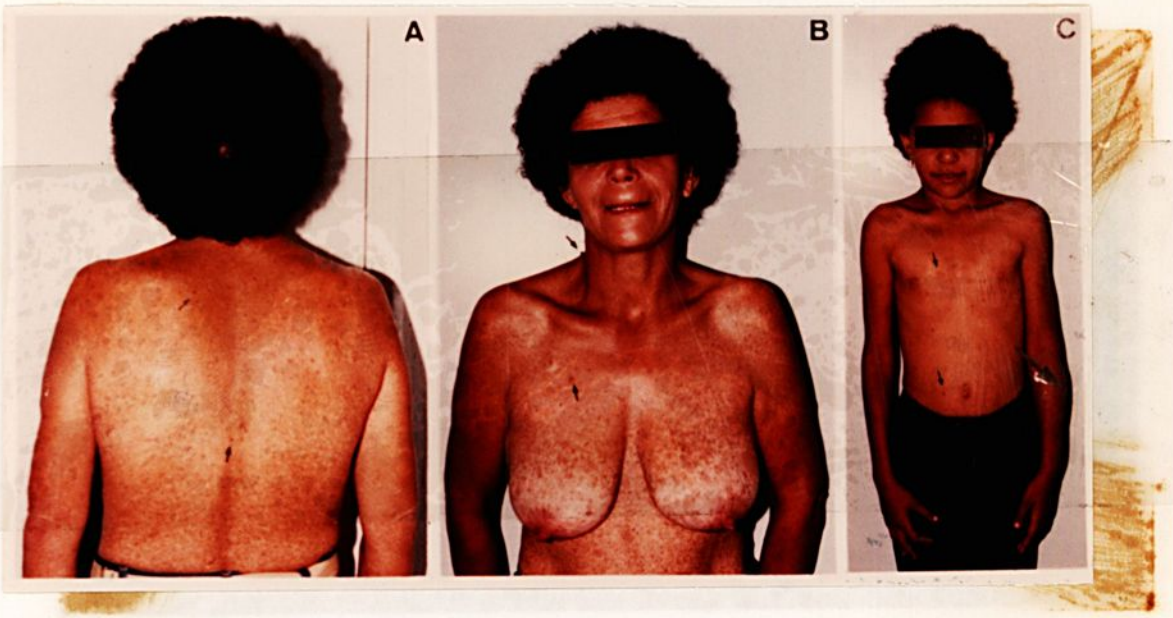


Figura 28. Caso 1-JR (NF1), em vistas (**A**) posterior e (**B**) anterior mostrando MCCL difusas, pequenos neurofibromas (setas); (**C**) vista anterior do caso 1-VR (NF1) com neurofibroma plexiforme em membro superior esquerdo (seta grande) e algumas MCCL (setas pequenas).



Figura 29. Vistas (**A**) anterior e (**C**) lateral do caso 2-CS (NF1) mostrando neurofibroma plexiforme com hiperpigmentação em face, região cervical e torácica, à direita e MCCL difusas; vistas (**B**) anterior e (**D**) lateral do caso 2-LS (NF1) com neurofibroma plexiforme com hiperpigmentação em face, região cervical e torácica, à esquerda e MCCL difusas; (**E**) vista anterior do caso 2-BS (NF1) mostrando poucos neurofibromas (seta) e MCCL difusas e pequenas.

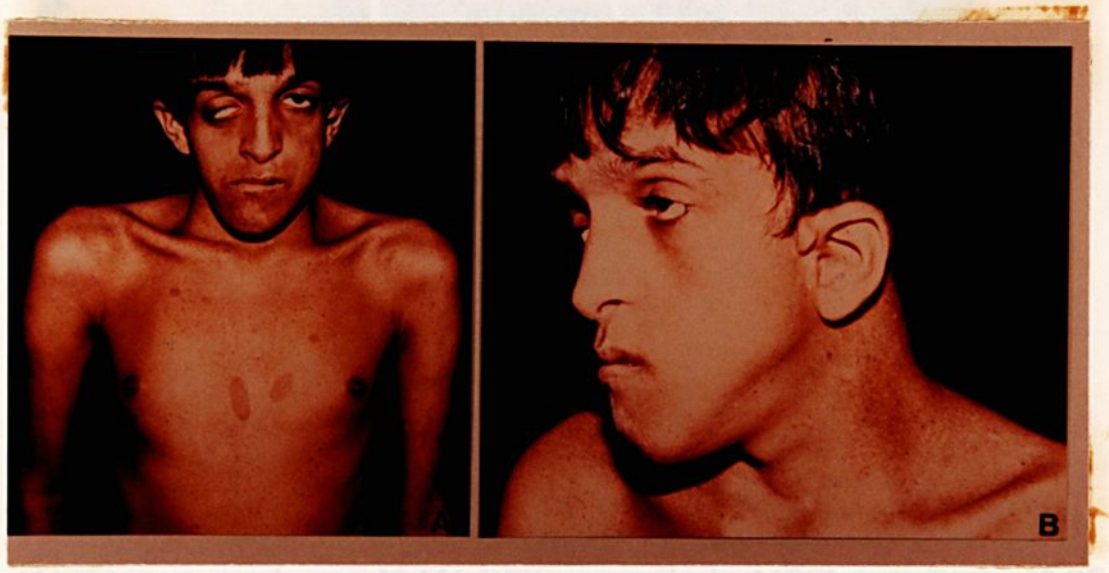


Figura 30. Caso 11-EA (NF1) em (**A**) vista anterior mostrando ptose palpebral, fendas palpebrais oblíquas para cima, hipertelorismo ocular, estrabismo, assimetria facial, orelhas grande e em abano, facies triangular, prognatismo, pescoço curto, hipertelorismo mamário e MCCL difusas, e em (**B**) vista lateral esquerda mostrando pavilhão auricular malformado, de implantação baixa e apêndice pré-auricular.



Figura 31. Caso 16-ZS (NF1), em (**A**) vista lateral direita mostrando acentuada cifose, lordose, poucos neurofibromas e MCCL difusas, e em (**B**) vista anterior mostrando hemihipotrofia facial à esquerda; (**C**) vista anterior do caso 16-IS (NF1) com poucos neurofibromas e MCCL difusas.

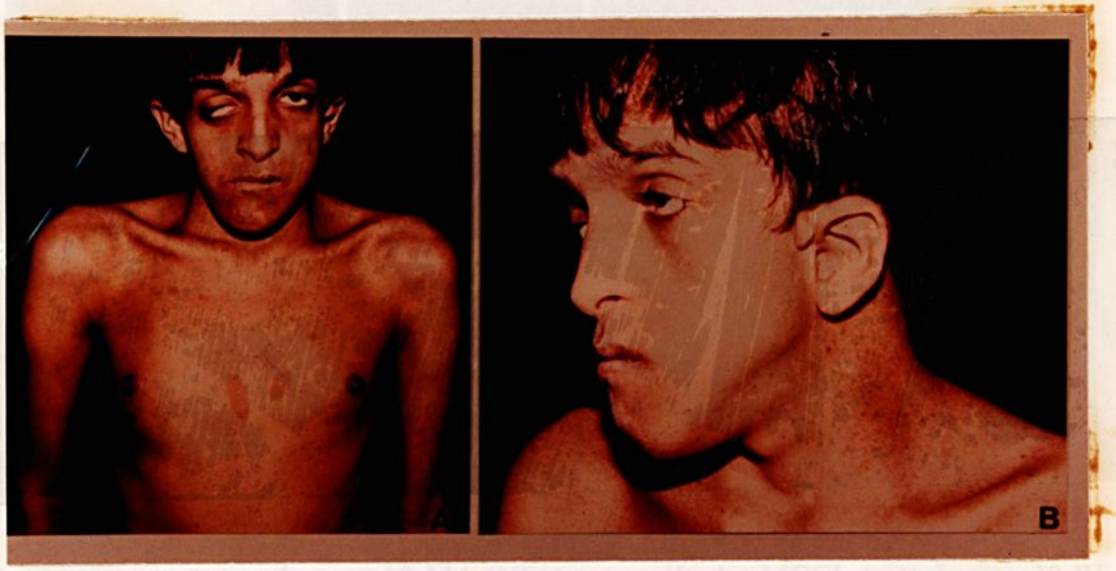


Figura 30. Caso 11-EA (NF1) em (**A**) vista anterior mostrando ptose palpebral, fendas palpebrais oblíquas para cima, hipertelorismo ocular, estrabismo, assimetria facial, orelhas grande e em abano, facies triangular, prognatismo, pescoço curto, hipertelorismo mamário e MCCL difusas, e em (**B**) vista lateral esquerda mostrando pavilhão auricular malformado, de implantação baixa e apêndice pré-auricular.

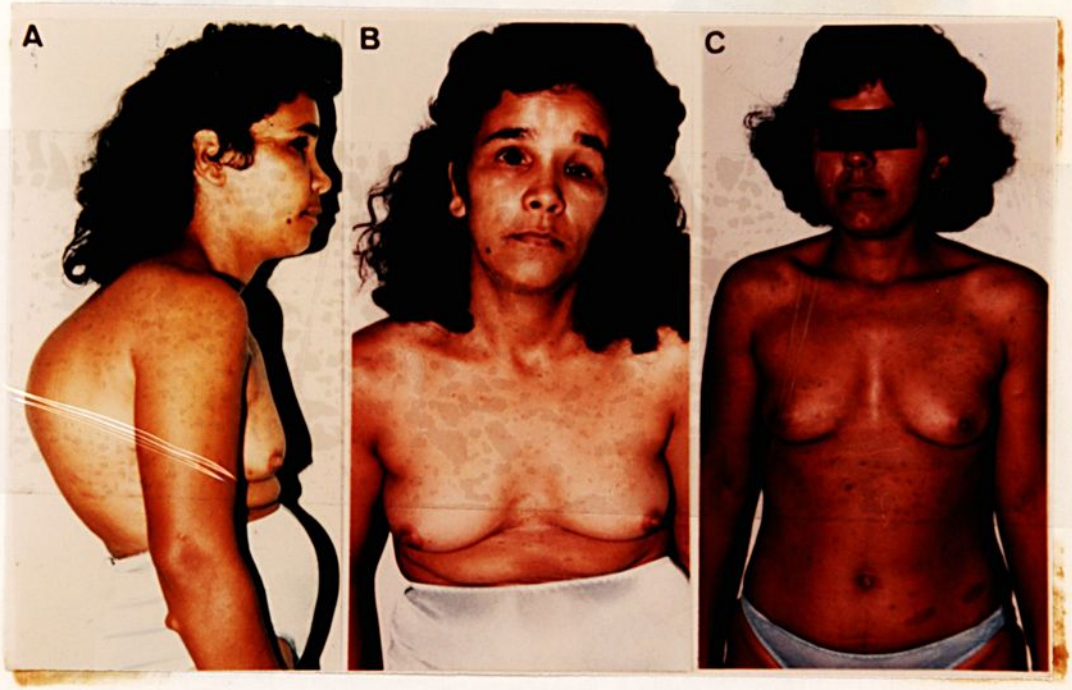


Figura 31. Caso 16-ZS (NF1), em (**A**) vista lateral direita mostrando acentuada cifose, lordose, poucos neurofibromas e MCCL difusas, e em (**B**) vista anterior mostrando hemihipotrofia facial à esquerda; (**C**) vista anterior do caso 16-IS (NF1) com poucos neurofibromas e MCCL difusas.



Figura 32. (**A**) vista posterior do caso 18-MA (NF6) com múltiplas MCCL (setas); caso 18-RF (NF6), em (**B**) vista anterior mostrando várias MCCL (setas) e membro superior esquerdo maior que o direito, e em (**C**) vista posterior com MCCL (setas), sindactilia cutânea e encurtamento das falanges do segundo e terceiro dedos da mão direita.



Figura 33. Caso 22-RB (NF1), em (**A**) vista anterior mostrando peito escavado, hérnia umbilical, micropênis e múltiplas MCCL, em (**B**) vista posterior mostrando MCCL difusas e em (**C**) vista anterior com fendas palpebrais oblíquas para cima, sinofre, hipertelorismo ocular, filtro naso-labial longo e retrognatia.



Figura 34. Caso 23-MU (NF1), em (**A**) vista anterior mostrando neurofibromas dérmicos difusos, inclusive em região areolar, em (**B**) vista anterior dos membros inferiores mostrando neurofibroma plexiforme em membro inferior esquerdo e em (**C**) vista lateral do membro inferior esquerdo.



Figura 35. Vista anterior do caso 24-LB (NF3) mostrando neurofibromas e MCCL difusas.



Figura 36. Caso 27-MT (NF5), em (**A**) vista anterior da região torácica com neurofibroma plexiforme em plexo branquial à direita e em (**B**) vista posterior mostrando duas MCCL (setas).



Figura 37. Caso 32-FR (NF1), em vistas (**A**) anterior, (**B**) lateral e (**C**) posterior com múltiplas alterações ósseas, MCCL difusas e neurofibromas dérmicos (seta menor) e pedunculados (seta maior).

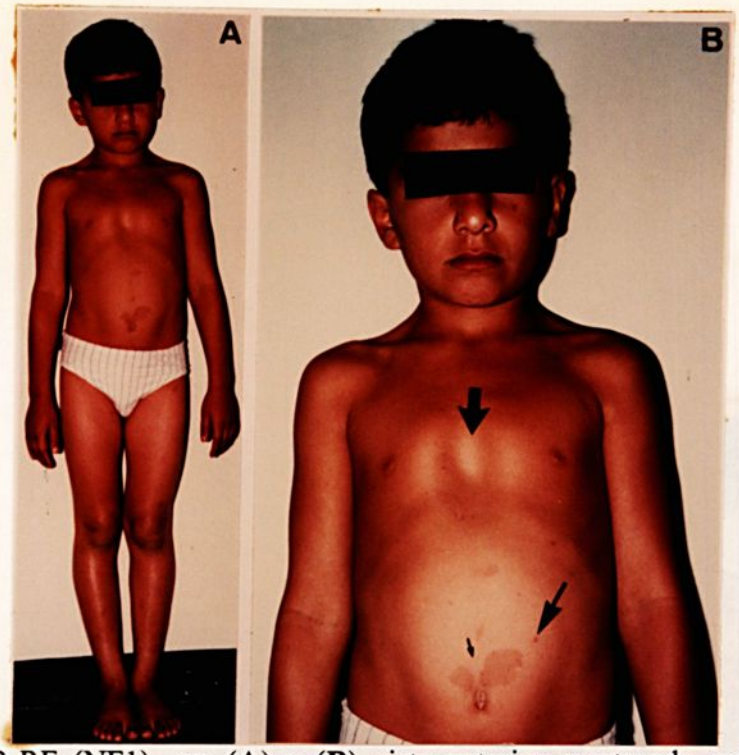


Figura 38. Caso 33-RF (NF1), em (**A**) e (**B**) vista anterior mostrando peito escavado (seta grande), MCCL (seta pequena) e neurofibroma (seta média).

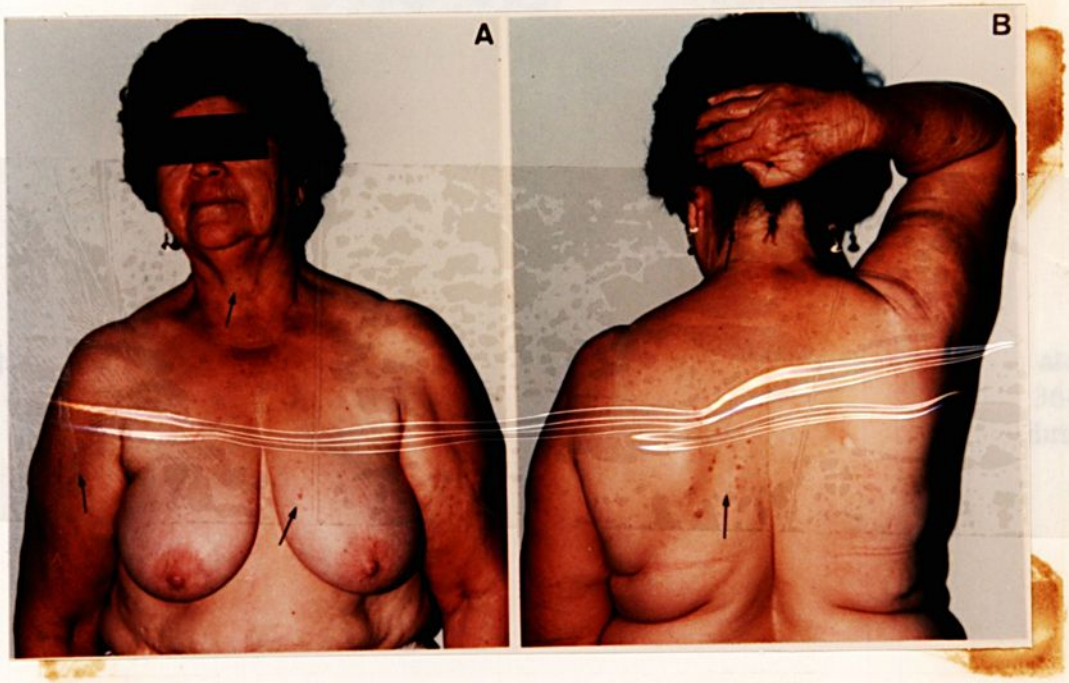


Figura 39. Caso 35-MG (NF7), em vistas (**A**) anterior e (**B**) posterior mostrando apenas poucos neurofibromas (setas).



Figura 40. Caso 36-RO (NF1), em vistas (**A**) anterior e (**B**) posterior com frequência alta de neurofibromas dérmicos difusos e neurofibroma pedunculado (seta); caso 36-MO (NF1), em vistas (**C**) anterior e (**D**) posterior com frequência baixa de neurofibromas dérmicos difusos, MCCL difusas e acentuada escoliose.



Figura 41. Vista anterior do caso 37-DP (NF1) mostrando implantação baixa das orelhas, raiz nasal baixa, narinas antivertidas, maxila proeminente, nevo em face, pescoço curto, tórax "em barril", clinodactilia de quinto dedo à direita e MCCL difusas.



Figura 42. Caso 40-TG (NF1), em (**A**) vista anterior mostrando orelhas grandes e em abano, múltiplas MCCL, sardas inguinais, MCCL em pênis e em (**B**) vista posterior mostrando escoliose e MCCL difusas.

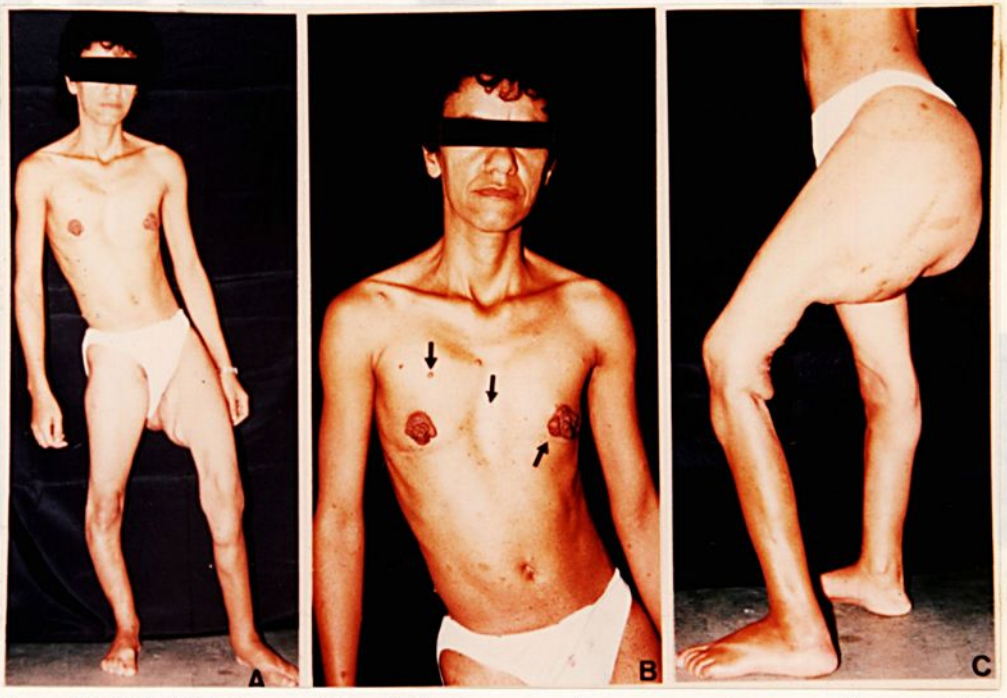


Figura 43. Caso 41-OR (NF1), em (**A**) e (**B**) vista anterior mostrando neurofibromas dérmicos, inclusive em região areolar, peito escavado (as setas indicam os sinais) e em (**C**) vista lateral dos membros inferiores mostrando neurofibroma plexiforme em membro inferior esquerdo.

Tabela 7. Frequências com que os principais sinais clínicos foram observados na amostra.

Sinais clínicos	Presença	Ausência	Não pesquisado	Frequência	%
1. MCCL	66	1	0	66/67	98,5
2. Neurofibroma	58	9	0	58/67	86,5
3. Sardas axilares	56	10	1	56/66	84,8
4. Nódulos de Lisch	41	18	8	41/59	70,0
5. Outras alt. oculares	44	8	15	44/52	84,6
6. Alterações ósseas	40	13	14	40/53	75,5
7. RM	13	16	37	13/30	43,4
8. Outras alt. psicológicas	30	0	37	30/30	100,0
9. Alterações de EEG	7	46	14	7/53	13,2
10. Alterações de ECG	13	30	24	13/43	30,2

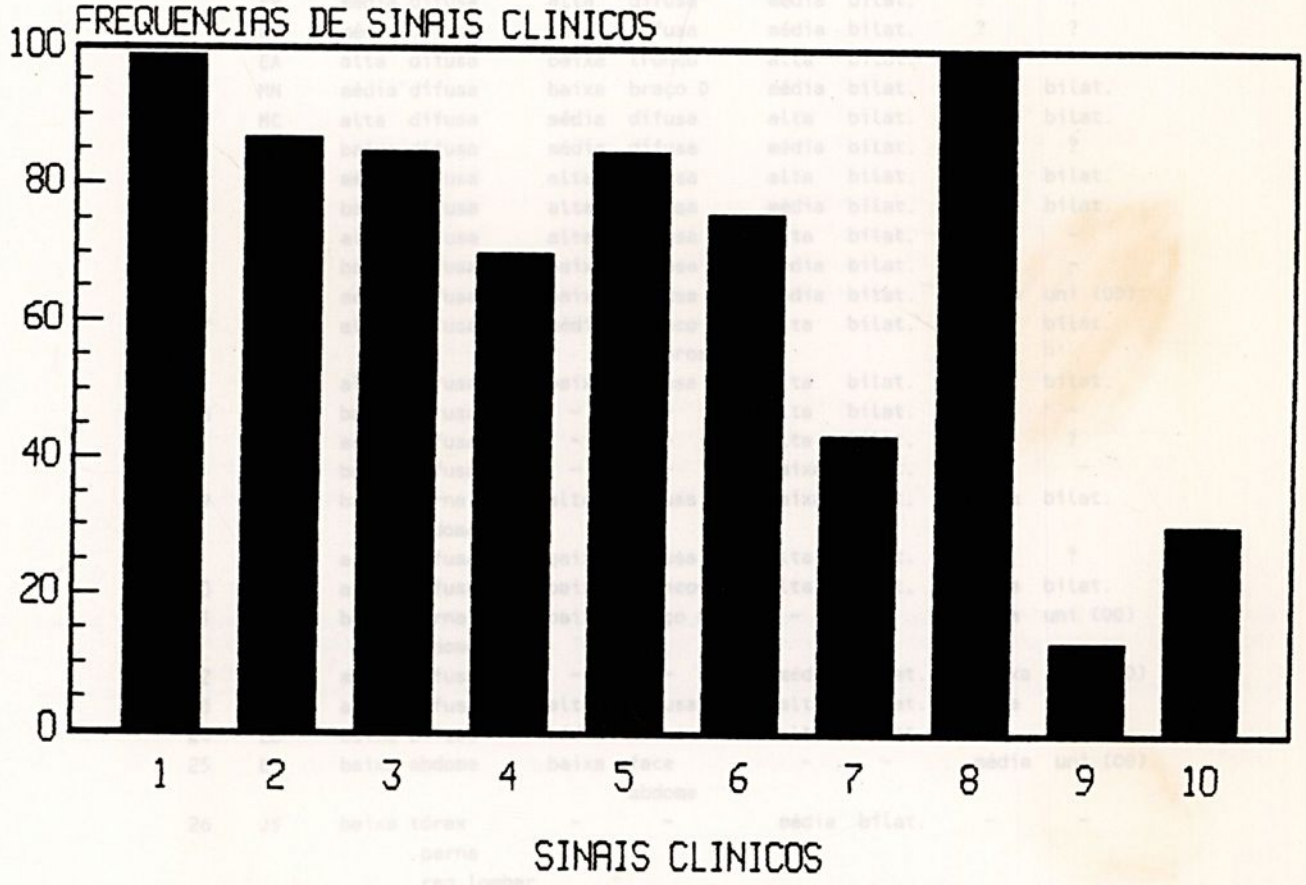


Figura 44. Representação gráfica das frequências dos sinais clínicos referidos na Tabela 7.

Tabela 8. Frequência e localização dos principais sinais clínicos dos pacientes.

Família	Indivíduo	MCCL		Neurofibromas		Sardas axilares		Nod. Lisch	
		Freq.	Local	Freq.	Local	Freq.	Local	Freq.	Local
1	JR	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	média	uni (OE)
	VR	média	difusa	baixa	antebr. E	média	bilat.	média	bilat.
2	BS	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
	CS	baixa	difusa	baixa	pescoço, face ombro	baixa	bilat.	baixa	bilat.
	LS	baixa	difusa	baixa	pescoço face ombro	baixa	bilat.	baixa.	bilat
3	AP	alta	difusa	média	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
	VM	alta	difusa	-	-	-	-	-	-
4	GP	média	difusa	baixa	perna D	média	bilat.	média	bilat.
5	EB	baixa	difusa	alta	difusa	média	bilat.	média	bilat.
6	AM	baixa	difusa	alta	difusa	baixa	bilat.	baixa	uni (OE)
7	LT	média	difusa	alta	difusa	média	bilat.	baixa	uni (OE)
8	LC	média	difusa	alta	difusa	média	bilat.	média	bilat.
9	IT	baixa	abdome ombro E	baixa	pelve D crânio	-	-	-	-
10	MV	média	difusa	alta	difusa	média	bilat	?	?
	AP	média	difusa	alta	difusa	média	bilat.	?	?
	PP	média	difusa	alta	difusa	média	bilat.	?	?
	RP	média	difusa	alta	difusa	média	bilat.	?	?
11	EA	alta	difusa	baixa	tronco	alta	bilat.	-	-
12	MN	média	difusa	baixa	braço D	média	bilat.	baixa	bilat.
13	MC	alta	difusa	média	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
14	SA	baixa	difusa	média	difusa	média	bilat.	?	?
15	JP	média	difusa	alta	difusa	alta	bilat.	média	bilat.
16	BS	baixa	difusa	alta	difusa	média	bilat.	baixa	bilat.
	AS	alta	difusa	alta	difusa	alta	bilat.	-	-
	IS	baixa	difusa	baixa	difusa	média	bilat.	-	-
	ZS	média	difusa	baixa	difusa	média	bilat.	baixa	uni (OD)
17	MS	alta	difusa	média	tronco membros	alta	bilat.	?	bilat.
	FS	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	?	bilat.
18	MA	baixa	difusa	-	-	alta	bilat.	-	-
	MF	média	difusa	-	-	alta	bilat.	?	?
	RF	baixa	difusa	-	-	baixa	bilat.	-	-
19	MP	baixa	perna E abdome	alta	difusa	baixa	bilat.	média	bilat.
	JR	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	?	?
20	AB	alta	difusa	baixa	tronco-face	alta	bilat.	média	bilat.
21	GE	baixa	perna D abdome D	baixa	braço D	-	-	baixa	uni (OD)
22	RB	média	difusa	-	-	média	bilat.	baixa	uni (OD)
23	MU	alta	difusa	alta	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
24	LB	baixa	difusa	média	difusa	alta	bilat.	-	-
25	EF	baixa	abdome	baixa	face abdome	-	-	média	uni (OD)
26	JS	baixa	tórax perna reg.lombar	-	-	média	bilat.	-	-

Freq. = frequência; bilat. = bilateral; uni = unilateral; OE = olho esquerdo; OD =olho direito; ? = não investigada; - = ausência da característica.

Tabela 8. continuação.

Família	Indivíduo	MCCL		Neurofibromas		Sardas axilares		Nod. Lisch	
		Freq.	Local	Freq.	Local	Freq.	Local	Freq.	Local
27	MT	-	-	baixa	plexo branquial	-	-	-	-
28	MJ	baixa	tronco	média	difusa	-	bilat.	baixa	bilat
	FJ	baixa	tronco	baixa	difusa	-	-	baixa	bilat.
29	IM	baixa	difusa	alta	difusa	média	bilat.	média	bilat.
	VM	média	difusa	média	difusa	média	bilat.	alta	bilat.
	JM	média	difusa	média	difusa	média	bilat.	?	?
	MM	baixa	tronco	baixa	tronco	baixa	bilat.	baixa	bilat.
30	AV	baixa	tronco	baixa	cabeca	-	-	-	-
31	WM	baixa	tronco	baixa	tronco	-	-	-	-
32	FR	baixa	difusa	média	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
	ER	alta	difusa	baixa	antebraço D	alta	bilat.	média	bilat.
33	RF	baixa	difusa	baixa	axila cabeça	baixa	bilat.	?	bilat.
34	CB	média	difusa	média	difusa	média	bilat.	-	-
35	MG	-	-	baixa	difusa	-	-	-	-
36	RO	baixa	tórax abdome	alta	difusa	alta	bilat.	baixa	bilat.
	MG	alta	difusa	média	difusa	alta	bilat.	alta	bilat.
37	DP	média	difusa	-	-	média	bilat.	alta	bilat.
38	LP	alta	difusa	média	difusa	média	bilat.	alta	bilat.
	GP	média	difusa	média	difusa	baixa	bilat.	média	bilat.
39	MB	alta	difusa	média	difusa	alta	bilat.	baixa	bilat.
40	TG	alta	difusa	-	-	baixa	bilat.	alta	bilat.
41	AR	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	média	bilat.
	OR	alta	difusa	baixa	difusa	alta	bilat.	?	?
	SG	baixa	tronco	baixa	olho	baixa	bilat.	alta	bilat.
42	CP	baixa	tronco braços	baixa	joelho	-	-	?	?
	RS	baixa	tronco	-	-	-	-	baixa	bilat
43	CA	baixa	difusa	baixa	boca-olho E	média	bilat.	alta	bilat.

Freq. = frequência; bilat. = bilateral; uni = unilateral; OE = olho esquerdo; OD =olho direito; ? = não investigada; - = ausência da característica.

Tabela 9. Frequências com que os sinais MCCL, neurofibromas, sardas axilares e nódulos de Lisch foram observados na amostra, divididos os indivíduos em adultos (igual ou maior de 18 anos) e crianças e jovens (até 17 anos).

Característica	Frequência																	
	Baixa				Média				Alta				NP	NI	TOTAL		TOTAL	
	1-17a	%	>18a	%	1-17a	%	>18a	%	1-17a	%	>18a	%			1-17a	%	>18a	%
MCCL	8	47,1	19	38,7	6	35,3	14	28,6	3	17,6	16	32,7	1	0	17	100,0	49	98,0
Neurofibroma	9	91,0	20	42,0	0		14	29,0	1	9,0	14	29,0	8	0	11	64,7	48	96,0
Sardas axilares	6	43,0	4	9,8	7	50,0	16	39,0	1	7,0	21	51,2	12	0	14	82,3	41	82,0
Nódulos de Lisch	4	45,4	10	35,7	3	27,3	10	35,7	3	27,3	9	28,6	14	13	11	68,7	28	73,6

NP = não presente; NI = não investigada; a = anos.

Tabela 10. Resultados das avaliações para determinação das variáveis quociente de inteligência (QI), presença de disfunções neurológicas, nível de depressão, níveis de ansiedade transitória e estável e distúrbio de déficit de atenção por hiperatividade realizadas em 30 pacientes.

Família	Indivíduo	QI		Disf. Neurol.		Depressão	Ansiedade		DDAH	
		valor	classificação	DPM	ICN		transitória	estável	sinais	classificação
1	JR	70	RM leve	+	+	DM moderada	moderada	alta	0	-
	VR	64	RM leve	+	+	DM moderada	moderada	moderada	0	-
3	AP	77	Limítrofe	+	+	-	leve	-	4	-
4	GP	81	Médio inferior	+	+	DM moderada	moderada	alta	5	leve
5	EB	62	RM leve	+	+	DM moderada	moderada	moderada	4	-
8	LC	60	RM leve	+	+	DM moderada	alta	alta	2	-
9	IT	68	RM leve	+	+	DM moderada	moderada	alta	6	-
10	MV	62	RM leve	+	+	DM moderada	alta	alta	2	-
12	MN	55	RM leve	+	+	DM moderada	alta	alta	5	-
13	MC	61	RM leve	+	+	DM moderada	alta	alta	7	-
16	BS	71	Limítrofe	+	+	Distimia	leve	leve	1	-
	IS	79	Limítrofe	+	+	DM severa	alta	alta	9	leve
	ZS	51	RM moderado	+	+	DM severa	moderada	alta	10	moderado
17	FS	102	Médio	-	-	DM moderada	moderada	alta	2	-
18	MA	84	Médio inferior	+	+	DM moderada	moderada	alta	5	-
20	AB	63	RM leve	+	-	DM moderada	moderada	alta	1	-
21	GE	80	Médio inferior	+	+	DM moderada	leve	alta	6	-
23	MU	56	RM leve	+	+	DM severa	alta	alta	11	moderado
26	JS	91	Médio	+	-	?	moderada	moderada	7	-
29	IM	90	Médio inferior	+	-	DM leve	alta	alta	3	-
31	WM	96	Médio	+	-	-	leve	-	4	-
32	ER	97	Médio	+	-	DM leve	-	-	3	-
	FR	88	Médio inferior	+	+	DM leve	-	-	3	-
33	RF	80	Limítrofe	+	+	DM moderada	leve	moderada	1	-
35	MG	66	RM leve	+	+	DM moderada	moderada	moderada	9	leve
36	MO	70	Limítrofe	+	+	-	moderada	moderada	3	-
41	AR	78	Limítrofe	+	+	DM moderada	moderada	moderada	6	-
	SG	82	Médio inferior	+	+	DM leve	moderada	moderada	8	leve
42	CP	74	Médio inferior	+	-	DM leve	moderada	alta	8	leve
	RS	53	RM leve	+	+	?	-	-	6	-

QI = coeficiente de inteligência; disf. neurol. = disfunções neurológicas; DDAH = distúrbio de déficit de atenção por hiperatividade; RM = retardo mental; DPM = déficit perceptivo-motor; ICN = indícios de comprometimento neurológico; DM = depressão maior; + = presença; - = ausência.

Tabela 11. Frequências dos pacientes enquadrados em diferentes classificações em cada variável, de acordo com o resultado das avaliações psicológicas.

Característica	Classificação	Frequência	%
QI 35-40/50-55	RM moderado	1/30	3,3
50-55/65-70	RM leve	12/30	40,0
70-85	Limítrofe	6/30	20,0
85-90	Médio inferior	7/30	23,4
90-110	Médio	4/30	13,3
Disf. neurológicas			
DPM	Presente	29/30	96,7
	Ausente	1/30	3,3
ICN	Presente	23/30	76,7
	Ausente	7/30	23,3
Depressão	Ausente	3/28	10,7
Maior	Leve	5/28	17,9
	Moderada	16/28	57,1
	Severa	3/28	10,7
Distimia		1/28	3,6
Ansiedade			
Transitória	Ausente	3/30	10,0
	Leve	5/30	16,7
	Moderada	15/30	50,0
	Alta	7/30	23,3
Estável	Ausente	5/30	16,7
	Leve	1/30	3,3
	Moderada	8/30	26,7
	Alta	16/30	53,3
DDAH			
Sinais 0	Ausência	2/30	6,7
1-7	Ausência	22/30	73,3
8-9	Leve	4/30	13,3
10-11	Moderado	2/30	6,7

QI = quociente de inteligência; RM = retardo mental; DPM = déficit perceptivo-motor; ICN = indícios de comprometimentos neurológico; DDAH = distúrbio de déficit de atenção por hiperatividade.

Tabela 12. Alterações ósseas observadas ao exame radiológico em 40 pacientes com NF, dos 53 investigados.

Alteração	Freq. absol.	%	Afetados Fam-Individuo	Figura
Escoliose	15	28,3	1-JR	45 B
			6-AM	
			9-IT	
			15-JP	
			16-BS,IS	
			17-MS	47 A
			19-JR	
			20-AB	
			25-EF	
			29-VM	
			36-MG	
			38-LP	
			41-AR,OR	
Cifoescoliose	9	17,0	5-EB	
			8-LC	
			13-MC	45 C,D
			24-LB	
			32-FR,ER	46
			34-CB	
			36-RO	
			40-TG	45 E
Peito escavado	6	11,3	3-AP	
			15-JP	
			16-IS	
			33-RF	38
			22-RB	
			41-OR	45 E
Alargamento de forâmen	6	11,3	2-CS	
			16-BS,IS	
			21-GE	
			32-ER	
			34-CB	
Atraso de maturação óssea	5	9,4	18-RF	
			22-RB	
			26-JS	
			37-DP	
			42-RS	
Vértebra de transição lombosacral	4	7,5	1-JR	45 A
			6-AM	
			16-AS	
			24-LB	
Fibroma cortical	4	7,5	26-JS	
			32-FR	
			33-RF	47 B
			41-SG	
Espinha bífida	3	5,7	2-LS	
			16-BS	
			41-SG	
Periostite	3	5,7	12-MN	
			35-MG	
			34-CB	47 C
Fusão de vértebras cervicais	3	5,7	3-AP	
			18-MA	
			41-AR	
Alargamento do mediastino	3	5,7	2-LS,CS	
			8-LC	
Geno valgo	2	3,8	13-MC	
			41-OR	43
Alteracao de morfologia vertebral	2	3,8	3-AP	
			16-IS	
Sela turca em "J"	1	1,9	42-RS	

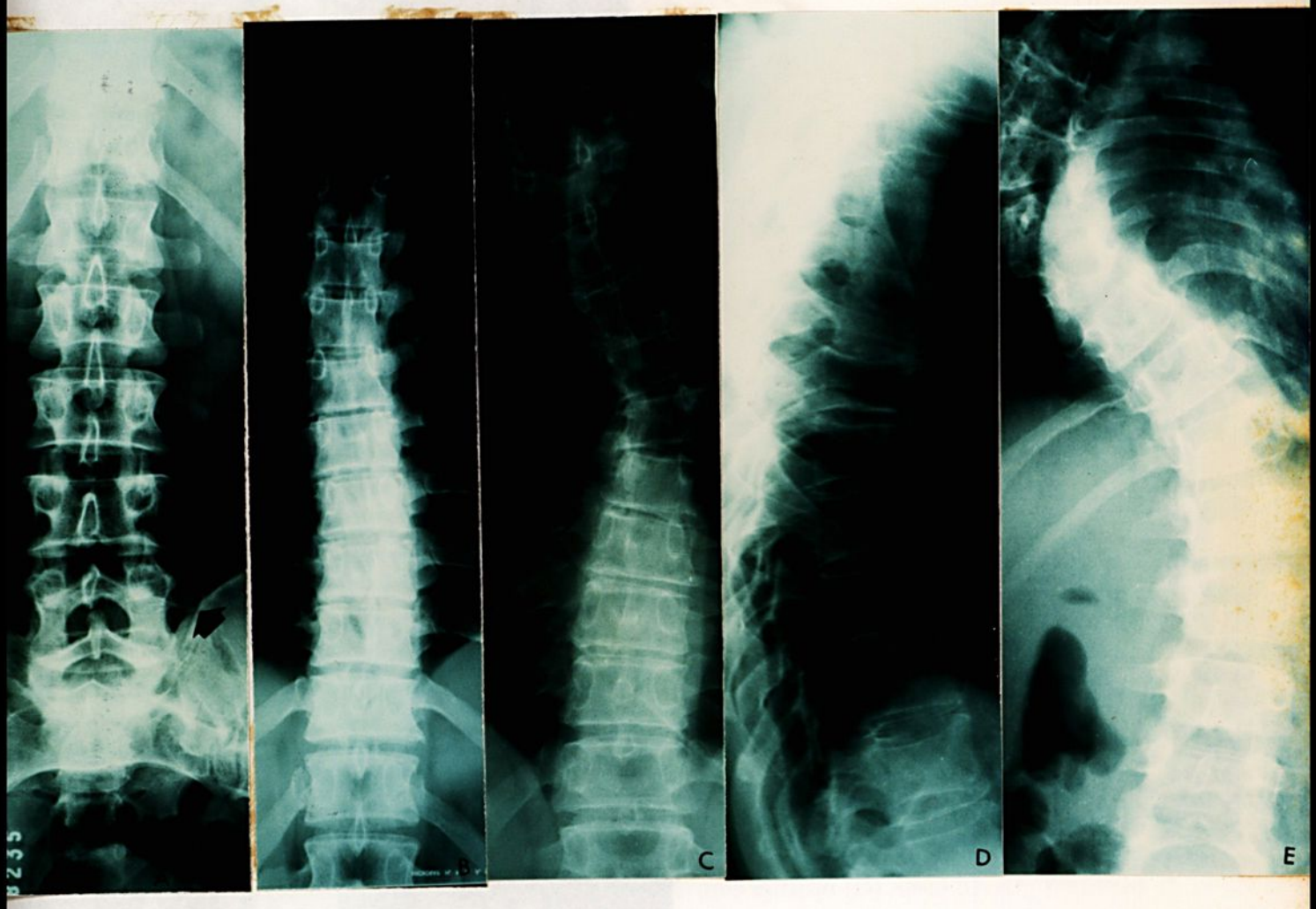


Figura 45. Vértebra de transição lombo sacral (A) e escoliose leve (B), caso 1-JR; escoliose moderada (C) e cifose (D), caso 13-MC; escoliose grave (E), caso 40-TG.



Figura 46. Radiografia de frente e perfil da paciente 32-FR, mostrando deformidade do arcabouço ósseo torácico que determina diminuição volumétrica dos pulmões, devido ao abaulamento dos arcos costais; ossos da bacia com tamanho reduzido; importante deformidade vertebral com desvio tóraco-lombar para a esquerda e acentuada angulação posterior determinando gibosidade proeminente com encurtamento vertebral longitudinal.



Figura 47. Escoliose lombar (A), caso 17-MS; fibroma cortical (B), caso 33-RF; periostite (C), caso 34-CB.

Tabela 13. Alterações oculares, excluídos os nódulos de Lisch, observadas em 44 pacientes com NF, de 52 investigados.

Família	Indivíduo	Baixa acuidade visual	Hipermetropia	Astigmatismo	Miopia	Estrabismo	Glaucoma	Catarata	Coroidose	Pterígio	Neurof. palbebral	Lesoes retina	Outras
1	JR		+	+						+			
	VR	+											+
2	BS									+			
	CS	+											
3	AP						+					+	+
	VM		+								+		
4	GP	+											
5	EB	+											
6	AM	+								+	+	+	
7	LT	+					+	+					
8	LC						+						
9	IT	+	+	+	+	+				+			
11	EA	+				+			+				
12	MN	+	+	+									+
13	MC	+		+	+								+
15	JP	+									+		
16	AS	+											+
	IS	+	+	+	+								+
	ZS												
17	MS	+	+										
	FS	+				+							
18	MA												+
19	MP	+											+
	JS	+											
20	AB	+	+	+									+
21	GE		+										
22	RB	+	+	+	+								+
23	MO	+		+					+	+	+		+
24	LB	+		+	+	+	+						
29	IF	+	+	+	+			+	+				+
	VM	+		+								+	
	ML									+			
31	WM	+		+	+			+	+		+		
32	FR									+			
	ER	+		+	+							+	
34	CB	+			+	+				+			
35	MG	+	+							+			+
36	RO	+		+	+						+		+
	MO					+							
39	MB	+								+	+		+
40	TG		+	+									
41	SG	+	+								+		
42	RS					+							+
43	CA	+	+	+	+								

Neurof. = neurofibroma; + = presença da característica; espaço não preenchido =ausência da característica.

Tabela 14. Frequências de alterações oculares em 44 pacientes com NF, de 52 investigados.

Alterações oculares	Nº. de pacientes	%
Baixa acuidade visual	31	60,0
Hipermetropia	14	27,0
Astigmatismo	17	33,0
Miopia	11	21,0
Pterígio	10	19,2
Neurofibroma palpebral	8	15,3
Estrabismo	6	11,5
Glaucoma	4	7,7
Coroidose	4	7,7
Lesões na retina	4	7,7
Catarata	3	5,7
Outras	17	32,6
Ausente	8	15,3

Tabela 15. Frequências das alterações eletrocardiográficas (ECG) em 13 pacientes com NF, de 43 investigados.

Alterações ECG	Família	Indivíduo	Frequência	%
Taquicardia sinusal	18	RF		
	32	RF		
	36	MO		
	2	CS		
	42	CP		
			5/43	11,6
Extra sístole ventricular	9	IT		
	25	EF		
	41	AR		
			3/43	7,0
Desvio do eixo elétrico QRS para a esquerda	5	EB		
			1/43	2,3
Desvio do eixo elétrico QRS para a direita	34	CB		
			1/43	2,3
Sobrecarga do ventrículo direito e alterações difusas da repolarização ventricular	39	MB		
			1/43	2,3
Bloqueio incompleto do ramo direito	40	TG		
			1/43	2,3
Taquicardia sinusal e bloqueio direcional antero-posterior	36	RO		
			1/43	2,3
Zona eletricamente inativa inferior	13	MC		
			1/43	2,3

Tabela 16. Outras características menos frequentes observadas nos pacientes com NF.

Característica	Família	Indivíduo	Frequência	Percentagem
Convulsões	2	LS		
	17	FS		
	19	MP		
	19	JR		
	30	AV		
	41	SG		
			6/67	9,0
Hiperglicemia	8	LC		
	12	BS		
	32	FS		
	34	CB		
	36	MO		
			5/67	7,4
Cefaléia	1	VR		
	8	LC		
	13	MC		
	19	MP		
	39	MB		
			5/67	7,4
Disartria	3	VM		
	24	LB		
	22	RB		
	23	MU		
	28	MJ		
			5/67	7,4
Hernia inguinal/ umbilical	3	VM		
	9	IT		
	34	CF		
	22	RB		
	42	RS		
			5/67	7,4
Hemorróida	6	AM		
	9	IT		
	13	MC		
	20	AB		
	24	LB		
			5/67	7,4
Problemas ginecologicos	1	JR		
	9	IT		
	21	GE		
	32	FR		
	41	OR		
			5/67	7,4
Infecções de repetição das vias aéreas e pneumonias	3	AP		
	3	VM		
	15	JP		
	41	SG		
			4/67	6,0
Ptose palpebral	3	VM		
	11	EA		
	20	AB		
	40	TG		
			4/67	6,0
Hipertensão arterial	5	EB		
	19	MP		
	39	MB		
	15	JP		
			4/67	6,0
Problemas gástricos	9	IT		
	12	MN		
	13	MC		
	24	LB		
			4/67	6,0
Constipação intestinal	1	VR		
	6	AM		
	8	LC		
	15	JP		
			4/67	6,0

III.2. Estudo citogenético

Foram desenvolvidos dois experimentos, visando investigar a ocorrência de instabilidade cromossômica espontânea e induzida por agentes mutagênicos de natureza química ou física, em linfócitos cultivados de pacientes com neurofibromatose. No primeiro experimento, as células dos indivíduos das amostras CI e PI foram expostas aos agentes bleomicina, mitomicina C e bromodesoxiuridina; no segundo, as células dos indivíduos CII e PII foram expostas a bleomicina e raios X.

A. Experimento com agentes químicos BLM, MMC e BrdU

As frequências absolutas e percentuais de células com anomalias cromossômicas estruturais, em cada um dos grupos experimentais de cada indivíduo das amostras CI e PI, são apresentadas na Tabela 17. Os eventos cromossômicos detectados nas culturas que não foram expostas a agentes mutagênicos foram considerados espontâneos.

As frequências de células com anomalias espontâneas variaram de 0 a 5% nos controles, e de 3% a 14% nos pacientes. Nas culturas expostas a BLM, as frequências de células com anomalias variaram de 4% a 18% nos controles e de 8% a 64% nos pacientes. Nas culturas expostas a MMC, variaram de 0 a 8% nos controles e de 6% a 34% nos pacientes, enquanto nas culturas expostas a BrdU variaram de 4% a 20% nos controles e de 4% a 58% nos 3 pacientes. Na amostra controle, a frequência percentual média de metáfases com anomalias espontâneas foi 1,8% e a de metáfases anômalas após tratamento com MMC foi 3,4%. As frequências de metáfases com anomalias foram maiores quando se utilizou os agentes mutagênicos BLM e BrdU (11%). Na amostra de pacientes, evidenciou-se o efeito mutagênico dos três agentes químicos utilizados, tendo sido observadas, em média, 7% de metáfases anômalas nas culturas não expostas, 33% nas expostas a BLM, 17% nas expostas a MMC e 27% nas expostas a BrdU.

As médias e os desvios padrões das frequências transformadas de metáfases com anomalias cromossômicas são apresentadas na Tabela 18. Os resultados da análise de variância (ANOVA) para comparação dessas frequências entre os diferentes tratamentos nas duas amostras constam da Tabela 19 e indicaram que a amostra P respondeu igualmente aos diferentes agentes químicos testados, o que não aconteceu na amostra C. Foram feitas

comparações múltiplas de Tukey 2 X 2, cujos resultados constam da Tabela 20, tendo sido evidenciado que os controles mostraram frequências mais baixas de anomalias quando as culturas foram submetidas a MMC e equivalentes quando tratadas com BLM e BrdU. As células com anomalias cromossômicas foram estatisticamente mais frequentes nos pacientes, quando comparados com os controles, nas culturas sem tratamento e nas tratadas com os diferentes agentes químicos, conforme se verifica na Tabela 21, que apresenta os resultados da estatística Z. Esses achados podem ser visualizados na Figura 48.

Para detectar possíveis diferenças entre pacientes e controles, em relação ao nível de intensidade do efeito do agente químico testado, aplicou-se o teste t de Student. Foram utilizadas as diferenças entre as médias de frequências de anomalias cromossômicas dos grupos tratados como parâmetro de comparação e as diferenças entre as médias do grupo sem tratamento como parâmetro invariável. Observou-se que a resposta dos pacientes aos agentes químicos BLM e MMC diferiu em intensidade da resposta dos controles ($t=2,09$; $P<0,05$ e $t=1,97$, $P<0,05$, respectivamente), ou seja, o aumento verificado nos pacientes foi significativamente maior que o acontecido nos controles. Contudo, em relação ao BrdU, não se detectou diferença significativa na intensidade da resposta entre pacientes e controles ($t=0,68$; $P>0,05$).

Para verificar se havia correlação entre as frequências de células com anomalias cromossômicas induzidas e espontâneas utilizou-se a correlação linear de Pearson (Tabela 22). A significância foi testada pelo teste t de Student. Não foi detectada correlação entre os valores dos grupos experimentais da amostra C, assim também como entre as frequências de células com anomalias cromossômicas espontâneas e de células com anomalias induzidas por BLM ou por BrdU, nos pacientes. Todavia, as demais correlações na amostra P mostraram-se positivas e significativas.

Na Tabela 23 são apresentadas as frequências de células com diferentes números de eventos anômalos. Pode-se observar que, em ambas as amostras, a maioria das células com anomalias apresentava um evento por célula. No entanto, a observação de dois, três, quatro e cinco ou mais anomalias por célula foi mais comum nos pacientes, principalmente nas culturas tratadas com bleomicina. A Figura 49 ilustra as frequências relativas de células com diferentes números de eventos anômalos nos quatro grupos experimentais nas amostras CI e PI. A comparação estatística do número médio de eventos anômalos por célula entre as amostras CI e PI mostrou diferenças significativas entre elas ($t=387,69$; $P<0,05$). Realizou-se tal comparação

entre os tratamentos similares das amostras CI e PI, que também detectou diferenças significativas, sendo que o grupo dos pacientes apresentou sempre frequências mais elevadas em todas as situações testadas, conforme mostra a Tabela 24.

Na Tabela 25 são apresentadas as frequências de metáfases que mostraram apenas quebras cromossômicas ou cromatídicas, de metáfases que exibiam apenas falhas cromossômicas ou cromatídicas e de metáfases que tinham simultaneamente eventos do tipo quebra e do tipo falha, nos indivíduos das duas amostras e em cada tratamento. Verificou-se que as metáfases com o evento quebra foram mais frequentes em todas as situações, com exceção apenas das culturas dos indivíduos controles tratadas com MMC. As metáfases com ambos os tipos de eventos foram raras na amostra CI, mas, na amostra de pacientes observou-se frequências mais altas nos tratamentos com BLM e BrdU, respectivamente. Para verificar se as distribuições de metáfases com quebras, com falhas e com ambas diferiram entre os tratamentos das amostras CI e PI, utilizou-se o teste qui-quadrado. Este teste revelou diferenças nas distribuições de metáfases com esses eventos entre pacientes e controles, quando submetidos ao mesmo tratamento. Também mostrou diferença significativa quando se comparou a distribuição de metáfases com esses eventos (b,g e b+g) dentro de cada amostra. A Tabela 26 mostra os resultados dessas análises.

As frequências com que as metáfases com quebras cromatídicas ou cromossômicas se distribuiram nos grupos experimentais foram comparadas dentro de cada amostra. No controle detectou-se diferença estatisticamente significativa (qui-quadrado=31,31; $P<0,05$) e, com o objetivo de identificar os grupos experimentais que diferiam entre si, utilizou-se o teste Z (Tabela 27). As metáfases com quebras nao diferiram quando se comparou o grupo ST com o MMC ($Z=1,54$; $P>0,05$) e quando se comparou o grupo BLM com o BrdU ($Z=0,78$; $p>0,05$). As demais comparações mostraram-se significativas (Tabela 27). Da mesma forma, foi detectada diferença estatística entre os grupos experimentais na amostra de pacientes (qui-quadrado = 184,82; $P<0,05$), sendo que todos diferiram entre si (Tabela 27).

As distribuições de metáfases com falhas mostraram-se significativamente diferentes na amostra CI (qui -quadrado=9,28; $P<0,05$) e na amostra PI (qui-quadrado=164,61; $P<0,05$). Na amostra controle observou-se apenas que o grupo ST diferiu do grupo BLM ($Z=2,06$; $P<0,05$) e do BrdU ($Z=2,29$; $P<0,05$), as demais comparações mostraram-se não significativas (Tabela 28). Nos pacientes não se observou diferença significativa na distribuição de metáfases com falhas, apenas na comparação do grupo BLM com o BrdU ($Z=1,86$; $P>0,05$).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18

Da Tabela 29 constam as frequências dos diferentes tipos de eventos anômalos encontrados, se quebras ou falhas e se de natureza cromatídica ou cromossômica, com a participação percentual de cada um deles no conjunto.

A Figura 50 ilustra algumas das anomalias cromossômicas detectadas. Os dados da Tabela 29 mostram que o evento do tipo quebra foi o mais frequente em todos os grupos experimentais das duas amostras, com frequências percentuais variando de 58,1% a 77,8% de quebras e de 22,2% a 41,9% de falhas. As quebras e falhas do tipo cromatídico foram mais frequentes nos grupos experimentais de CI e no grupo ST de PI, com frequências percentuais aproximadas de 60% de alterações cromatídicas e 40% de alterações cromossômicas. Nos demais grupos da amostra PI, a proporção de alterações cromatídicas e cromossômicas observadas foi de aproximadamente 1:1.

Tabela 17. Frequências absolutas e percentuais de células com anomalias cromossômicas estruturais (ACE) em cada grupo experimental das amostras controle (CI) e de pacientes (PI). ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina.

Amostra	Indivíduo	Frequências de cel. com ACE			
		ST	BLM	MMC	BrdU
CI	1 GS	1(1%)	9(18%)	2(4%)	5(10%)
	2 LJ	1(1%)	5(10%)	0	6(12%)
	3 AN	1(1%)	5(10%)	2(4%)	10(20%)
	4 PB	5(5%)	9(18%)	1(2%)	6(12%)
	5 AD	0	2(4%)	1(2%)	2(4%)
	6 MR	1(1%)	3(6%)	2(4%)	6(12%)
	7 DB	4(4%)	4(9%)	4(8%)	3(6%)
	Total	13(1,8%)	37(11%)	12(3,4%)	38(11%)
PI	14 SA	6(6%)	19(38%)	11(12%)	19(38%)
	16 AS	14(14%)	23(46%)	17(34%)	29(58%)
	1 VR	5(5%)	30(60%)	10(20%)	24(48%)
	12 MN	5(5%)	32(64%)	10(20%)	16(32%)
	8 LC	5(5%)	10(20%)	6(12%)	5(10%)
	29 IM	3(3%)	8(16%)	3(6%)	4(8%)
	9 IT	10(10%)	18(36%)	15(30%)	26(52%)
	19 MP	9(9%)	10(20%)	3(6%)	2(4%)
	32 FR	4(4%)	12(24%)	3(6%)	8(16%)
	2 LS	6(6%)	4(8%)	5(10%)	2(4%)
	Total	67(7%)	166(33%)	83(17%)	135(27%)

Tabela 18. Média e desvio padrão (X ± S) das frequências transforformadas de metáfases com anomalias cromos- sômicas e intervalos de confiança (95%), nos diferentes tratamentos. CI = controles; PI = pacientes; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina.

Amostra	GE	X ± S	Intevalo de confiança
CI			-------!---------!---------!---------!-----
	BLM	0,32 ± 0,09	(---------*---------)
	MMC	0,16 ± 0,09	(---------*---------)
	BrdU	0,33 ± 0,08	(---------*---------)
			-------!---------!---------!---------!-----
			0,10 0,20 0,30 0,40
PI			------!------!------!------!------!------
	BLM	0,60 ± 0,21	(----------*----------)
	MMC	0,39 ± 0,14	(-------*-------)
	BrdU	0,51 ± 0,26	(------------*------------)
			------!------!------!------!------!------
			0,28 0,42 0,56 0,70 0,80

Tabela 19. Análise de variância para comparação das frequências médias transformadas de células com anomalias cromos- sômicas entre os diferentes tratamentos nas amostras CI e PI. * : P < 0,05, NS : P > 0,05.

FV	GL	SR	QM	F	Significância
Amostra CI	2	0,12	0,06	7,69	*
Resíduo	18	0,14	0,01		
Total	20	0,25			
Amostra PI	2	0,22	0,11	2,60	NS
Resíduo	27	1,16	0,04		
Total	29	1,38			

Tabela 20. Comparações múltiplas de Tukey 2 X 2 entre os grupos tratados da amostra CI. BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; DMS=0,09; * : P<0,05; NS : P>0,05.

Grupos	Resultados	Significância
BLM x MMC	0,17	*
BLM x BrdU	0,01	NS
MMC x BrdU	0,18	*

Tabela 21. Estatística Z para comparação das frequências de células com anomalias cromossômicas entre as amostras de pacientes e controles, nos quatro grupos experimentais (GE). ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; Zcrítico = 1,94; * : Zobservado > Zcrítico.

GE	Estatística Z	Significância
ST	24,03	*
BLM	8,70	*
MMC	7,32	*
BrdU	6,16	*

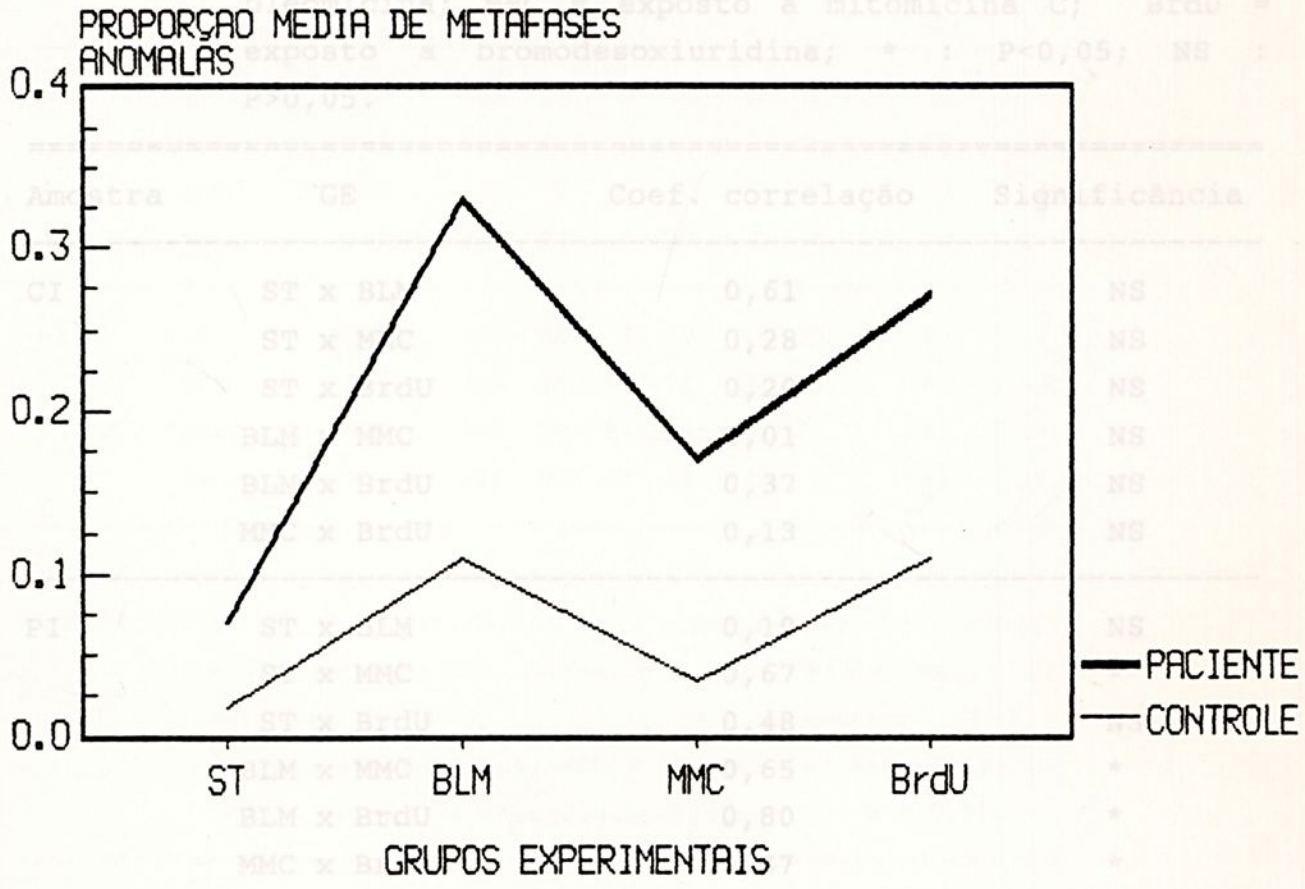


Figura 48. Representação gráfica das frequências de metáfases com anomalias cromossômicas nos quatro grupos experimentais nas amostras de pacientes e controles.

Tabela 22. Correlação linear de Pearson para verificar associação entre as frequências de células com anomalias cromossômicas dos grupos experimentais (GE). ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; * : P<0,05; NS : P>0,05.

Amostra	GE	Coef. correlação	Significância
CI	ST x BLM	0,61	NS
	ST x MMC	0,28	NS
	ST x BrdU	0,20	NS
	BLM x MMC	0,01	NS
	BLM x BrdU	0,37	NS
	MMC x BrdU	0,13	NS
PI	ST x BLM	0,19	NS
	ST x MMC	0,67	*
	ST x BrdU	0,48	NS
	BLM x MMC	0,65	*
	BLM x BrdU	0,80	*
	MMC x BrdU	0,87	*

Tabela 23. Frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos nos quatro grupos experimentais das amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina.

Amostra	GE	Nº. células analisadas	Eventos/célula						Total cels./ anomalias	
			0	1	2	3	4	>5	No.	%
CI	ST	700	684	13	0	0	0	0	13	1,8
	BLM	350	313	26	8	0	2	1	37	11,0
	MMC	350	338	9	3	0	0	0	12	3,4
	BrdU	350	312	28	7	1	1	1	38	11,0
PI	ST	1000	933	60	5	2	0	0	67	7,0
	BLM	500	334	79	31	21	9	26	166	33,0
	MMC	500	417	57	19	4	2	1	83	17,0
	BrdU	500	365	91	30	9	5	0	135	27,0

Tabela 24. Teste t de Student para comparações do número médio de eventos anômalos por célula entre as amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; * = $P < 0,05$.

Comparações	Estatística t	Significância
CI x PI	387,69	*
ST-CI x ST-PI	24,50	*
BLM-CI x BLM-PI	101,96	*
MMC-CI x MMC-PI	87,79	*
BrdU-CI x Brdu-PI	153,94	*

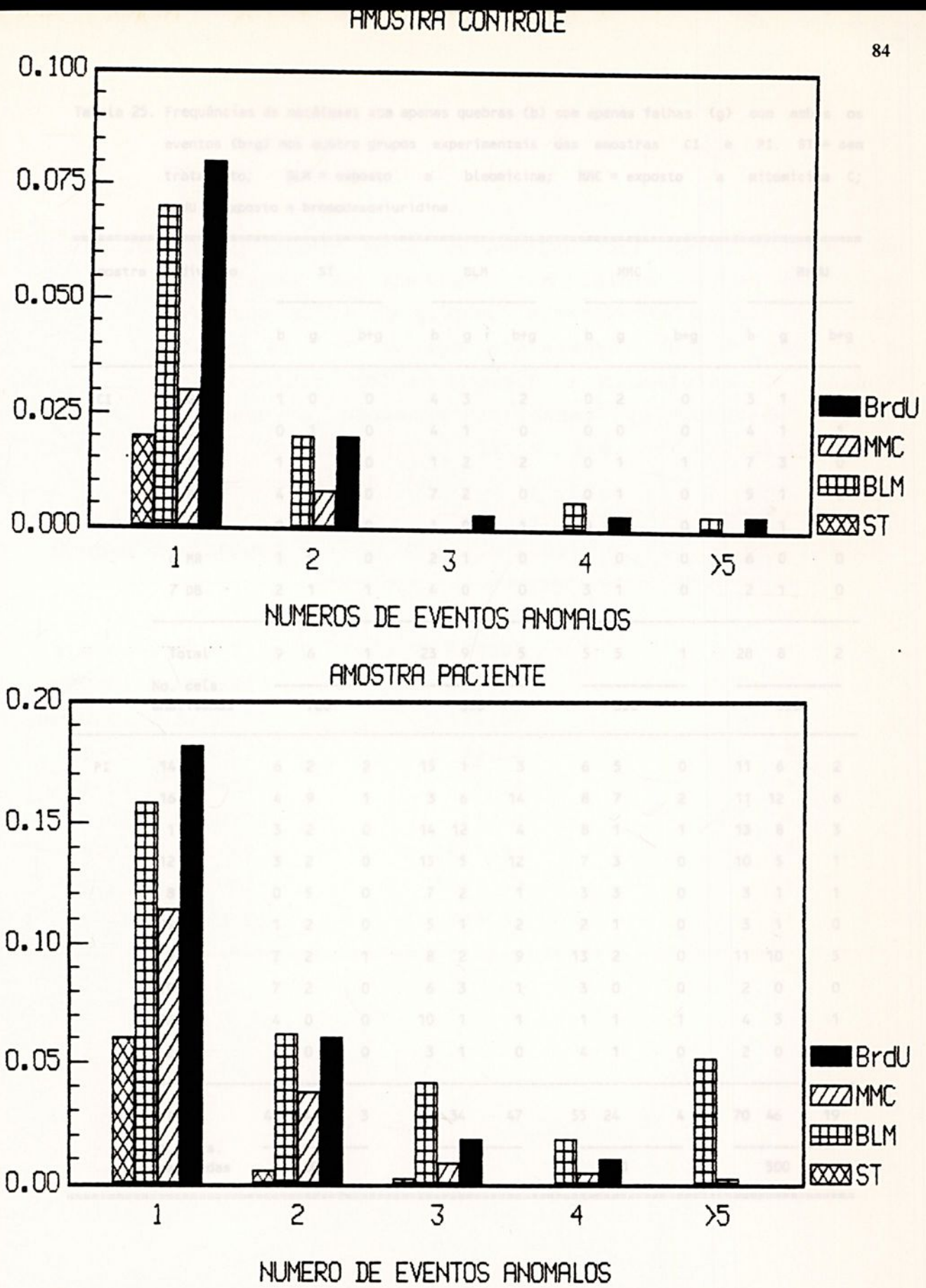


Figura 49. Representação gráfica das frequências relativas de células com diferentes números de eventos anômalos nos quatro grupos experimentais das amostras CI e PI.

Tabela 25. Frequências de metáfases com apenas quebras (b) com apenas falhas (g) com ambos os eventos (b+g) nos quatro grupos experimentais das amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina.

Amostra	Indivíduo	ST			BLM			MMC			BrdU		
		b	g	b+g	b	g	b+g	b	g	b+g	b	g	b+g
CI	1 GS	1	0	0	4	3	2	0	2	0	3	1	1
	2 LJ	0	1	0	4	1	0	0	0	0	4	1	1
	3 AN	1	0	0	1	2	2	0	1	1	7	3	0
	4 PB	4	4	0	7	2	0	0	1	0	5	1	0
	5 AD	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
	6 MR	1	0	0	2	1	0	2	0	0	6	0	0
	7 DB	2	1	1	4	0	0	3	1	0	2	1	0
	Total	9	6	1	23	9	5	5	5	1	28	8	2
	No. cels. analisadas	700			350			350			350		
PI	14 SA	6	2	2	15	1	3	6	5	0	11	6	2
	16 AS	4	9	1	3	6	14	8	7	2	11	12	6
	1 VR	3	2	0	14	12	4	8	1	1	13	8	3
	12 MN	3	2	0	15	5	12	7	3	0	10	5	1
	8 LC	0	5	0	7	2	1	3	3	0	3	1	1
	29 IM	1	2	0	5	1	2	2	1	0	3	1	0
	9 IT	7	2	1	8	2	9	13	2	0	11	10	5
	19 MP	7	2	0	6	3	1	3	0	0	2	0	0
	32 FR	4	0	0	10	1	1	1	1	1	4	3	1
	2 LS	6	0	0	3	1	0	4	1	0	2	0	0
	Total	40	24	3	85	34	47	55	24	4	70	46	19
	No. cels. analisadas	1000			500			500			500		

Tabela 26. Qui-quadrado para comparação das distribuições de metáfases com quebras, com falhas e com ambos os eventos entre os grupos experimentais das amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; qui-quadrado com 1 grau de liberdade, 5% = 3,8; * = qui-quadrado observado > 3,8.

Grupos comparados	Qui-quadrado	Significância
ST-CI x ST-PI	7,97	*
BLM-CI x BLM-PI	408,08	*
MMC-CI x MMC-PI	515,24	*
BrdU-CI x BrdU-PI	172,98	*
ST-CI x BLM-CI	33,32	*
ST-CI x MMC-CI	5,38	*
ST-CI x BrdU-CI	44,43	*
ST-PI x BLM-PI	2827,90	*
ST-PI x MMC-PI	437,53	*
ST-PI x BrdU-PI	1803,51	*

Tabela 27. Teste Z para comparações das distribuições de metáfases com quebras nas amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina; Zcrítico = 1,94; * = Zobservado > Zcrítico; NS = Zobservado < Zcrítico.

Amostra	Grupos comparados	Estatística Z	Significância
CI	ST x BLM	2,80	*
	ST x MMC	1,64	NS
	ST x BrdU	3,58	*
	BLM x MMC	3,80	*
	BLM x BrdU	0,78	NS
	MMC x BrdU	4,52	*
PI	ST x BLM	10,38	*
	ST x MMC	5,46	*
	ST x BrdU	8,31	*
	BLM x MMC	6,05	*
	BLM x BrdU	3,08	*
	MMC x BrdU	2,98	*

Tabela 28. Teste Z para comparações das distribuições de metáfases com falhas nas amostras CI e PI. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; MMC = exposto a mitomicina C; BrdU = exposto a bromodesoxiuridina.Zcrítitico=1,94; * = Zobservado > Zcritico; NS = Zobservado < Zcrítico.

Amostra	Grupos comparados	Estatística Z	Significância
CI	ST x BLM	2,06	*
	ST x MMC	0,69	NS
	ST x BrdU	2,29	*
	BLM x MMC	1,35	NS
	BLM x BrdU	0,21	NS
	MMC x BrdU	1,58	NS
PI	ST x BLM	9,74	*
	ST x MMC	3,77	*
	ST x BrdU	8,14	*
	BLM x MMC	5,99	*
	BLM x BrdU	1,86	NS
	MMC x BrdU	4,19	*

Tabela 29. Frequências absolutas e percentuais de quebras e falhas de natureza cromossômica (CS) ou cromatídica (CT) nos quatro grupos experimentais das amostras CI e PI.

Amostra	Grupo Experimental	Evento	Quebras		Falhas		Total	
			No	%	No	%	No	%
CI	ST	CS	5	31,3	0		5	31,3
		CT	5	31,2	6	37,5	11	68,7
		total	10	62,5	6	37,5	16	100,0
	BLM	CS	21	38,2	1	1,8	22	40,0
		CT	16	29,1	17	30,8	33	60,0
		total	37	67,3	18	32,7	55	100,0
	MMC	CS	5	33,3	1	6,7	6	40,0
		CT	4	26,7	5	33,3	9	60,0
		total	9	60,0	6	40,0	15	100,0
	BrdU	CS	22	40,8	0		22	40,8
		CT	20	37,0	12	22,2	32	59,2
		total	42	77,8	12	22,2	54	100,0
PI	ST	CS	25	33,0	6	7,8	31	40,8
		CT	19	25,1	26	34,1	45	59,2
		total	44	58,1	32	41,9	76	100,0
	BLM	CS	210	43,1	51	10,5	261	53,6
		CT	109	22,4	117	24,0	226	46,4
		total	319	65,5	168	34,5	487	100,0
	MMC	CS	56	46,7	13	10,8	69	57,5
		CT	27	22,5	24	20,0	51	42,5
		total	83	69,2	37	30,8	120	100,0
	BrdU	CS	76	40,7	20	10,7	96	51,4
		CT	38	20,3	53	28,3	91	48,6
		total	114	61,0	73	39,0	187	100,0

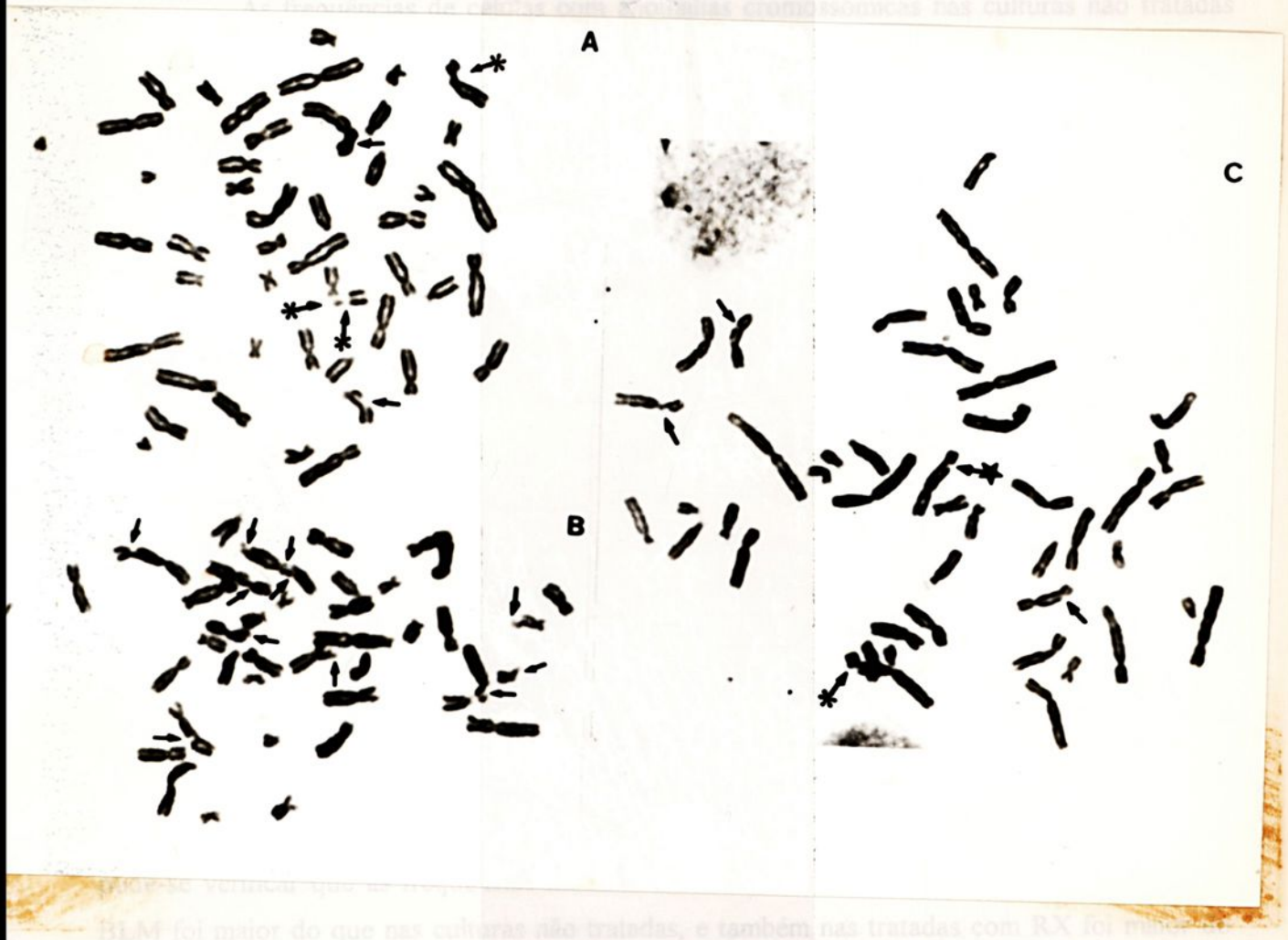


Figura 50. Metáfases de pacientes com NF apresentando diferentes números de eventos anômalos. (A) metáfase com duas quebras cromatídicas (setas) e três quebras cromossômicas (setas com asterisco) induzidas por MMC; (B) metáfase com onze quebras quebras induzidas por BLM (setas); (C) metáfase com três quebras cromatídicas (setas), uma quebra cromossômica (seta com asterisco) e uma falha cromatídica (seta com estrela) induzidas por BrdU.

B. Experimento com bleomicina e raios X

As frequências absolutas e percentuais de células com anomalias cromossômicas, em cada um dos grupos experimentais de cada indivíduo das amostras CII e PII, são apresentadas na Tabela 30.

As frequências de células com anomalias cromossômicas nas culturas não tratadas variaram de 0 a 6% nos controles e de 4% a 16% nos pacientes. Nas culturas expostas a BLM variaram de 4% a 10% nos controles e de 22% a 32% nos pacientes, e nas expostas a raios X (RX) variaram de 4% a 36% nos controles, e de 34% a 56% nos pacientes.

A frequência percentual média de metáfases com anomalias espontâneas foi 1,6% na amostra controle, 6,7% nas culturas tratadas com BLM e 20,3% nas tratadas com RX. Na amostra de pacientes, foram observadas 10% de metáfases com anomalias espontâneas, 26% com anomalias induzidas por BLM e 47,1% com anomalias induzidas por RX. O agente com potencial mutagênico mais eficaz em ambas as amostras foi RX.

As médias e os desvios padrões das frequências de metáfases com anomalias cromossômicas são apresentadas na Tabela 31. Para comparação dentro e entre as amostras CII e PII utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis. Quando se comparou os diferentes tratamentos dentro de cada amostra, detectou-se que eles produziram resultados estatisticamente diferentes (Tabela 32). Foram, então, realizadas comparações múltiplas para detectar as diferenças entre os grupos experimentais de cada amostra (Tabela 33). Ao nível de significância de 5% (95% de confiança), observou-se que a frequência média de metáfases com anomalias na amostra CII foi estatisticamente diferente nas culturas tratadas com RX quando comparadas com as não tratadas. Nas demais comparações, não se observou diferença significativa. No entanto, pode-se verificar que as frequências médias de metáfases anômalas nas culturas tratadas com BLM foi maior do que nas culturas não tratadas, e também nas tratadas com RX foi maior do que nas tratadas com BLM. Quando se considerou o nível de significância de 10% (90% de confiança), constatou-se diferenças estatisticamente significativas em todas as comparações realizadas na amostra CII (Tabela 33). BLM e RX induziram frequências elevadas de anomalias cromossômicas. No entanto, nos pacientes, as frequências de anomalias cromossômicas induzidas por RX foram estatisticamente maiores do que as induzidas por BLM.

As células com anomalias cromossômicas foram estatisticamente mais frequentes no pacientes que nos controles, tanto nas culturas sem tratamento como nas tratadas com os dois agentes mutagênicos, conforme se verifica na Tabela 34, que mostra os resultados da estatística H. Esses dados são apresentados graficamente na Figura 51. Tais resultados confirmam os

achados anteriores de que as metáfases com anomalias espontâneas são mais frequentes nos pacientes e reforçam a conclusão de que esses expressam instabilidade cromossômica.

Na Tabela 35 são apresentadas as frequências de células com diferentes números de eventos anômalos. Pode-se observar que, em ambas as amostras, no grupo ST a maioria das células com anomalias só apresentou um evento por célula. Resultados semelhantes ocorreram nas culturas tratadas com BLM na amostra CII. Já nos pacientes, havia algumas metáfases com dois eventos por célula (15%) e poucas com três, quatro, cinco ou mais eventos anômalos. Nas culturas tratadas com RX, havia um número maior de eventos por célula em ambas as amostras. Na amostra CII, observou-se 31% das células com um evento anômalo, 30% com dois eventos, 17% com três eventos, 7% com quatro eventos e 15% com cinco ou mais eventos. Na amostra PII, observou-se 50% das metáfases com um evento por célula, 3% com dois eventos, 19% com três eventos, 11% com quatro eventos e 17% com cinco ou mais eventos por metáfase. A Figura 52 ilustra tais achados nas amostras CII e PII.

Para testar se as distribuições dos eventos pelas células alteradas diferiam entre e dentro das amostras utilizou-se o teste qui-quadrado de homogeneidade, supondo distribuição de Poisson. As comparações entre as amostras, entre os tratamentos das amostras CII e PII e entre os tratamentos dentro de cada amostra, mostraram resultados significativamente diferentes, conforme consta da Tabela 36.

As alterações cromossômicas estruturais mais comumente observadas foram do tipo quebras, falhas, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos e cromossomos em anel. Outros tipos, como deficiências e duplicações de segmentos cromossômicos e cromossomos marcadores foram observados em frequência muito baixa. A Figura 53 ilustra alguns desses achados.

Na Tabela 37 são apresentadas as frequências absolutas de células com diferentes números de eventos do tipo quebras e falhas. Na amostra controle, esses eventos ocorreram principalmente com a frequência de um por célula, nos três grupos experimentais. Na amostra de pacientes, os eventos do tipo quebra ocorreram em 88% das metáfases com anomalias como um único evento e em 12% das metáfases como dois eventos no grupo sem tratamento; em 82% das metáfases como evento único e em 14% como dois eventos, em 3% como três eventos e em 1% como cinco ou mais eventos no grupo exposto a BLM. No grupo exposto aos RX, em 82% das metáfases com anomalias as quebras ocorreram uma só vez, em 11% ocorreram duas vezes, em 5% três vezes e em 2% quatro, cinco ou mais vezes. Por outro lado, a alteração do tipo falha foi observada em frequência menor do que a alteração do tipo quebra, e observada apenas uma

vez por célula, com exceção apenas das culturas tratadas com RX na amostra PII, que apresentaram três células com duas falhas.

A Tabela 38 mostra as frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos do tipo cromossomo dicêntrico e fragmento acêntrico. Na amostra controle não foram observadas tais alterações nas culturas sem tratamento. Nas culturas tratadas com BLM, situação semelhante foi observada na amostra de pacientes. No entanto, quando as culturas são tratadas com RX, esses eventos são observados em frequências elevadas. Na amostra controle, observaram-se 29 células com dicêntricos, sendo que 27 apresentaram um por célula e duas apresentaram dois dicêntricos por célula, e 52 células com acêntricos, sendo que na grande maioria dos casos os fragmentos apareciam na frequência de um por célula. Na amostra de pacientes tratada com RX, esses eventos foram ainda mais comuns. Foram observadas 102 metáfases com dicêntricos, sendo que em 88 delas eles apareceram na frequência de um por célula e em 14 células apareceram como dois eventos por célula. Acêntricos foram vistos em 129 metáfases, sendo que em 90 delas foi observado um fragmento por célula, em 23 dois fragmentos, em 13 três fragmentos e em 03 células quatro ou mais eventos.

Também foram observadas alterações estruturais dos tipos cromossomos em anel e outras, como deficiências e duplicações de segmentos cromossômicos e cromossomos marcadores com frequências muito baixas. A Tabela 39 mostra as frequências absolutas de células com tais eventos, que são observados nas culturas tratadas com RX e, com raras exceções, nos outros grupos experimentais.

A Tabela 40 mostra as frequências absolutas e percentuais dos tipos de eventos anômalos, permitindo verificar os mais frequentes em cada tratamento das duas amostras. Assim, as culturas sem tratamento e as tratadas com BLM, em ambas as amostras, apresentam quase que exclusivamente alterações dos tipos quebras e falhas, sendo as primeiras observadas em maior frequência em todos os casos, principalmente nos pacientes expostos a BLM, os quais mostram 79% de quebras e 20,4% de falhas. Nas culturas tratadas com RX, os tipos de eventos mais frequentes em ambas as amostras foram fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e quebras. No entanto, tais eventos foram sempre mais comuns na amostra PII: 37,5% foram do tipo fragmentos acêntricos, 26,7% foram do tipo quebras e 23,3% do tipo cromossomos dicêntricos. A Figura 54 ilustra graficamente as frequências percentuais desses achados nas amostras CII e PII.

unesp

Tabela 30. Frequências absolutas e percentuais de células com anomalias cromossômicas estruturais (ACE) em cada grupo experimental das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX = exposto a radiação X.

Amostra	Indivíduo	Células com ACE		
		ST	BLM	RX
CII	8 EB	0	2(4%)	5(10%)
	9 IG	1(2%)	4(8%)	7(14%)
	10 LA	1(2%)	2(4%)	10(20%)
	11 NS	0	3(6%)	2(4%)
	12 MM	1(2%)	2(4%)	14(28%)
	13 CR	1(2%)	4(8%)	18(36%)
	14 LG	0	4(8%)	17(34%)
	15 JA	3(6%)	5(10%)	8(16%)
	16 SP	0	4(8%)	10(20%)
	Total	7(1,6%)	30(6,7%)	91(20,3%)
PII	21 GE	8(8%)	16(32%)	28(56%)
	28 MJ	6(12%)	15(30%)	27(54%)
	5 EB	5(10%)	12(24%)	28(56%)
	3 AP	2(4%)	13(26%)	25(50%)
	7 LT	8(16%)	15(30%)	21(42%)
	17 MS	5(10%)	15(30%)	25(50%)
	18 MA	6(12%)	11(22%)	23(46%)
	20 AB	7(14%)	12(24%)	21(42%)
	33 RF	3(6%)	10(20%)	17(34%)
	10 RP	5(10%)	14(28%)	26(52%)
	23 MU	5(10%)	10(20%)	18(36%)
	Total	60(10%)	143(26%)	259(47,1%)

Tabela 31. Média e desvio padrão (X ± s) das frequências observadas de metáfases com anomalias cromossômicas nos grupos experimentais (GE) das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX = exposto a radiação X.

Amostra	GE	X	± s
CII	ST	0,02	0,04
	BLM	0,06	0,02
	RX	0,20	0,11
PII	ST	0,10	0,03
	BLM	0,26	0,05
	RX	0,47	0,07

Tabela 32. Análise de Kruskall-Wallis (estastística H) para comparação das frequências médias de células com anomalias cromossômicas entre os diferentes tratamentos nas amostra CII e PII. * : P < 0,01 e NS : P> 0,01.

Amostra	Valor da estatística H	Grau de liberdade	Significância
CII	17,53	2	*
PII	28,35	2	*

Tabela 33. Comparações múltiplas entre os diferentes grupos experimentais nas amostras CII (DMS10% = 7,25; DMS5% = 8,75) e PII (DMS=9,65) ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX = exposto a radiação X; * = P < DMS; NS = P > DMS.

Amostra	Grupos Experimentais	Resultados	Significância 5%	Significância 10%
CII	ST x BLM	7,70	NS	*
	ST x RX	15,70	*	*
	BLM x RX	8,00	NS	*
PII	ST x BLM	11,00	*	
	ST x RX	22,00	*	
	BLM x RX	11,00	*	

Tabela 34. Estatística H para comparação das frequências de células com anomalias cromossômicas entre as amostras CII e PII, nos três grupos experimentais. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X; GE = grupos experimentais; * : P < 0,001.

GE	Estatística H	Graus de liberdade	Significância
ST	9,94	1	*
BLM	14,14	1	*
RX	13,02	1	*

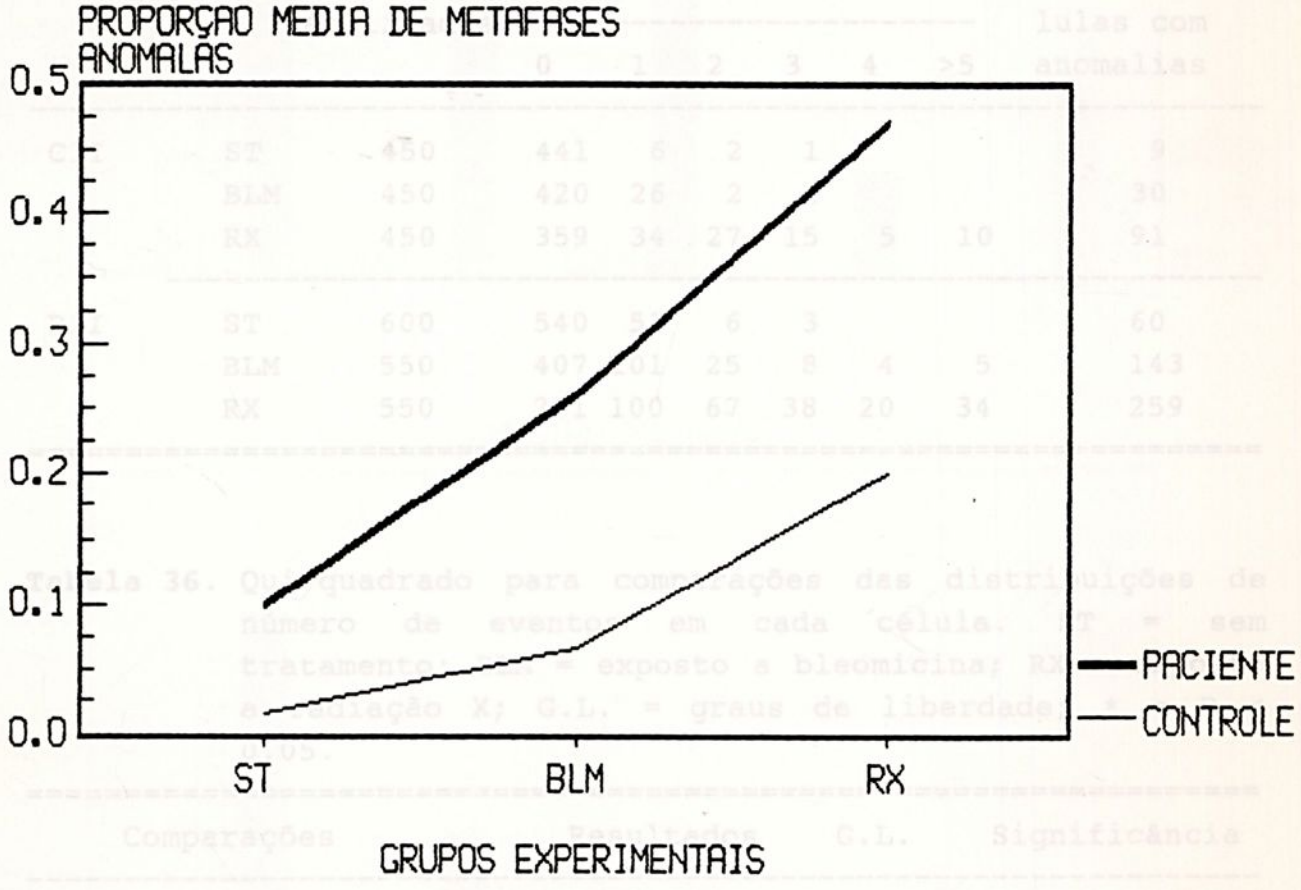


Figura 51. Comparação gráfica das frequências de metáfases com anomalias cromossômicas nos três grupos experimentais entre as amostras CII e PII.

Tabela 35. Frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos nos três grupos experimentais das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X; GE = grupos experimentais.

Amostra	GE	No.células analisadas	Eventos anômalos/célula						Total de células com anomalias
			0	1	2	3	4	>5	
CII	ST	450	441	6	2	1			9
	BLM	450	420	26	2	2			30
	RX	450	359	34	27	15	5	10	91
PII	ST	600	540	51	6	3			60
	BLM	550	407	101	25	8	4	5	143
	RX	550	291	100	67	38	20	34	259

Tabela 36. Qui-quadrado para comparações das distribuições de número de eventos em cada célula. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX = exposto a radiação X; G.L. = graus de liberdade; * = P < 0,05.

Comparações	Resultados	G.L.	Significância
CII x PII	2847,31	8	*
ST-CII x ST-PII	860,26	3	*
BLM-CII x BLM-PII	331,08	3	*
RX-CII x RX-PII	1916,11	7	*
ST-CII x BLM-CII	26,57	2	*
BLM-CII x RX-CII	572,51	5	*
ST-PII x BLM-PII	291,51	2	*
BLM-PII x RX-PII	1505,21	5	*

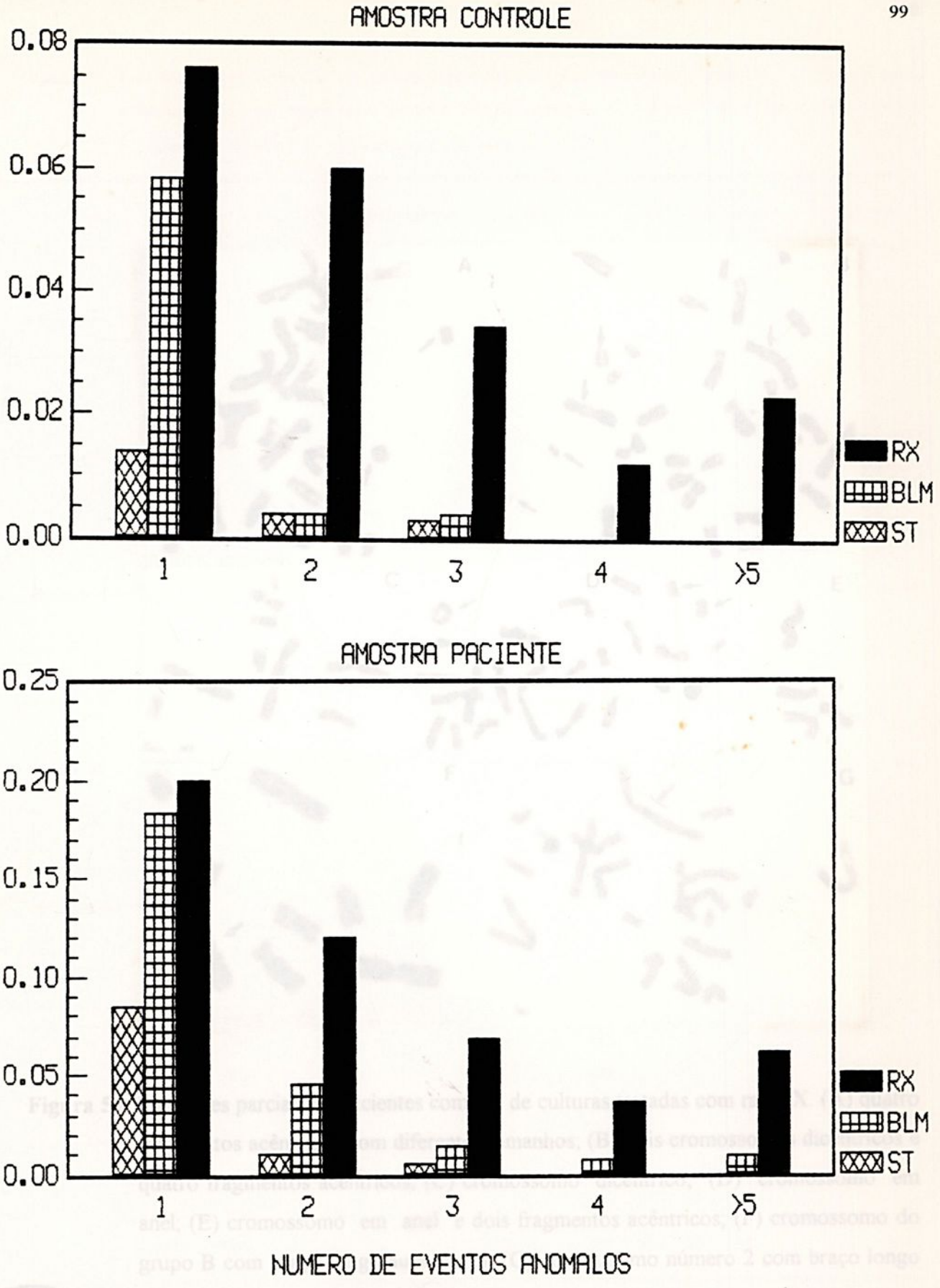


Figura 52. Representação gráfica das frequências relativas de células com diferentes números de eventos anômalos nos três grupos experimentais das amostras CII e PII.

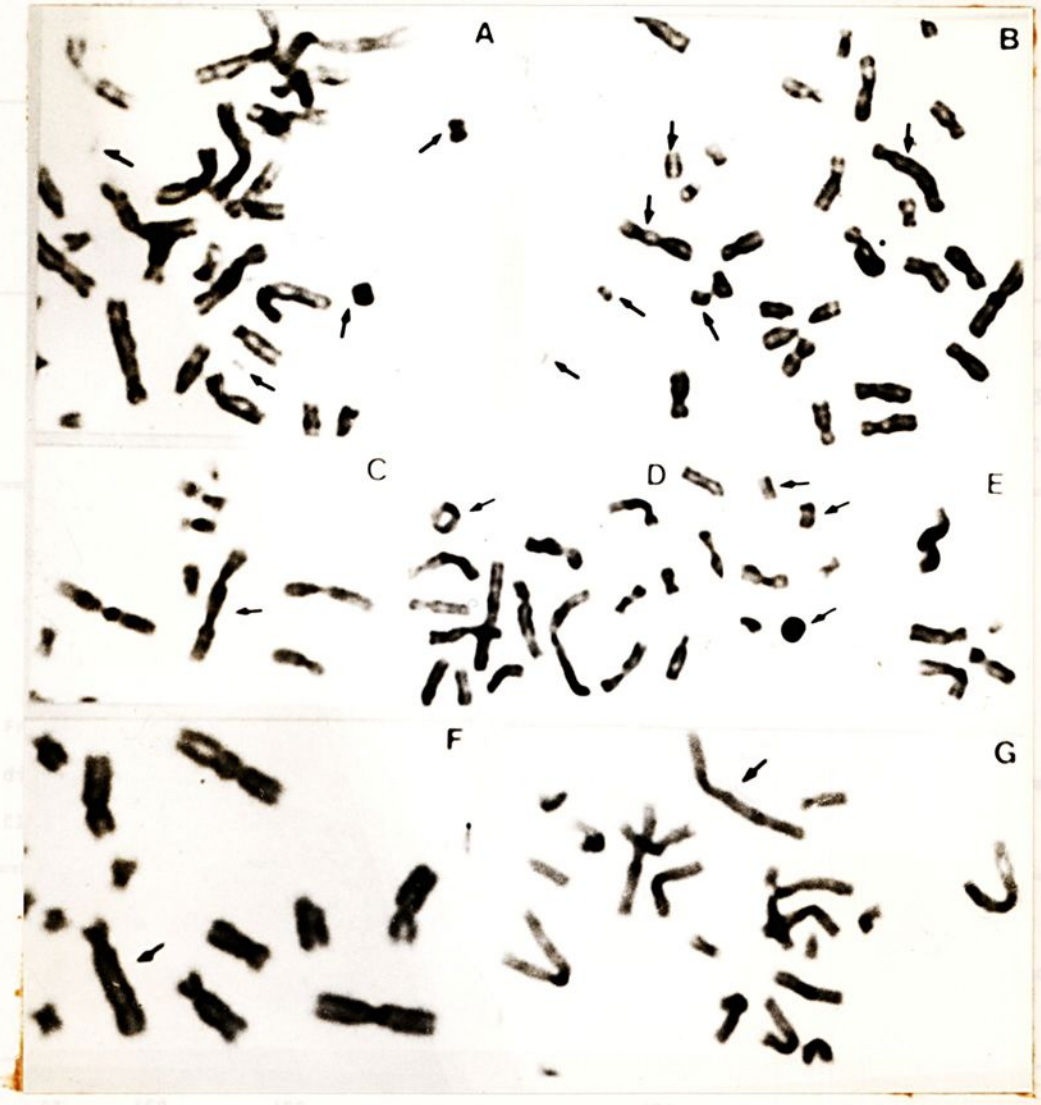


Figura 53. Metáfases parciais de pacientes com NF de culturas tratadas com raios X. (A) quatro fragmentos acêntricos com diferentes tamanhos; (B) dois cromossomos dicêntricos e quatro fragmentos acêntricos; (C) cromossomo dicêntrico; (D) cromossomo em anel; (E) cromossomo em anel e dois fragmentos acêntricos; (F) cromossomo do grupo B com braço longo aumentado; (G) cromossomo número 2 com braço longo aumentado. As setas indicam as anomalias.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
unesp

Tabela 37. Frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos do tipo quebras e falhas, nos três grupos experimentais (GE) das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X.

Amostra	GE	No de cels analisadas	Nº· quebras/célula					Total cels. com quebras	Nº·falhas/célula			Total cels. com falhas
			0	1	2	3	>4		0	1	2	
CII	ST	450	443	6	1			7	448	1	1	2
	BLM	450	428	20		2		22	442	8		8
	RX	450	428	20	2			22	448	1	1	2
PII	ST	600	567	30	4			34	577	23		23
	BLM	550	436	94	16	3	1	114	517	30	3	33
	RX	550	446	85	12	5	2	104	532	18		18

Tabela 38. Frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos dos tipos dicêntricos (dic) e fragmentos acêntricos (ace) nos três grupos experimentais(GE) das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X.

Amostra	GE	Nº·de cels analisadas	Nº· dic/cel.			Total cels. com dic	Nº·ace/cel.					Total cels. com ace
			0	1	2		0	1	2	3	>4	
CII	ST	450	450				450					
	BLM	450	450				450					
	RX	450	421	27	2	29	398	34	9	6	3	52
PII	ST	600	600				600					
	BLM	550	550				547					
	RX	550	448	88	14	102	421	90	23	13	3	129

Tabela 39. Frequências absolutas de células com diferentes números de eventos anômalos dos tipos cromossomos em anel (r) e outros tipos (deficiências, duplicação de segmentos cromossômicos, cromossomos marcadores) nos três grupos experimentais (GE) das amostras CII e PII. ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X.

Amostra	GE	Nº.de cels analisadas	r/cel.		Total cels. com r	Outros eventos/cel.			Total cels. com outros. eventos
			0	1		0	1	2	
CII	ST	450	450			450			
	BLM	450	450			450			
	RX	450	441	9	9	447	3		3
PII	ST	600	600			600			
	BLM	550	549	1	1	550			
	RX	550	523	27	27	437	9	4	13

Tabela 40. Frequências absolutas e percentuais dos tipos de eventos anômalos nos diferentes tratamentos das amostras CII e PII; ST = sem tratamento; BLM = exposto a bleomicina; RX= exposto a radiação X; b = quebras; g = falhas; ace = fragmentos acêntricos; dic = cromossomos dicêntricos; r = cromossomo em anel.

Amostra	GE	b		g		ace		dic		r		outras	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
CII	ST	8	72,7	3	27,3								
	BLM	26	76,5	8	23,5								
	RX	24	15,8	3	2,0	82	53,9	31	20,4	9	5,9	3	2,0
PII	ST	38	62,3	23	37,7								
	BLM	140	79,0	36	20,4					1	0,6		
	RX	133	26,7	18	3,6	187	37,5	116	23,3	27	5,4	17	3,4

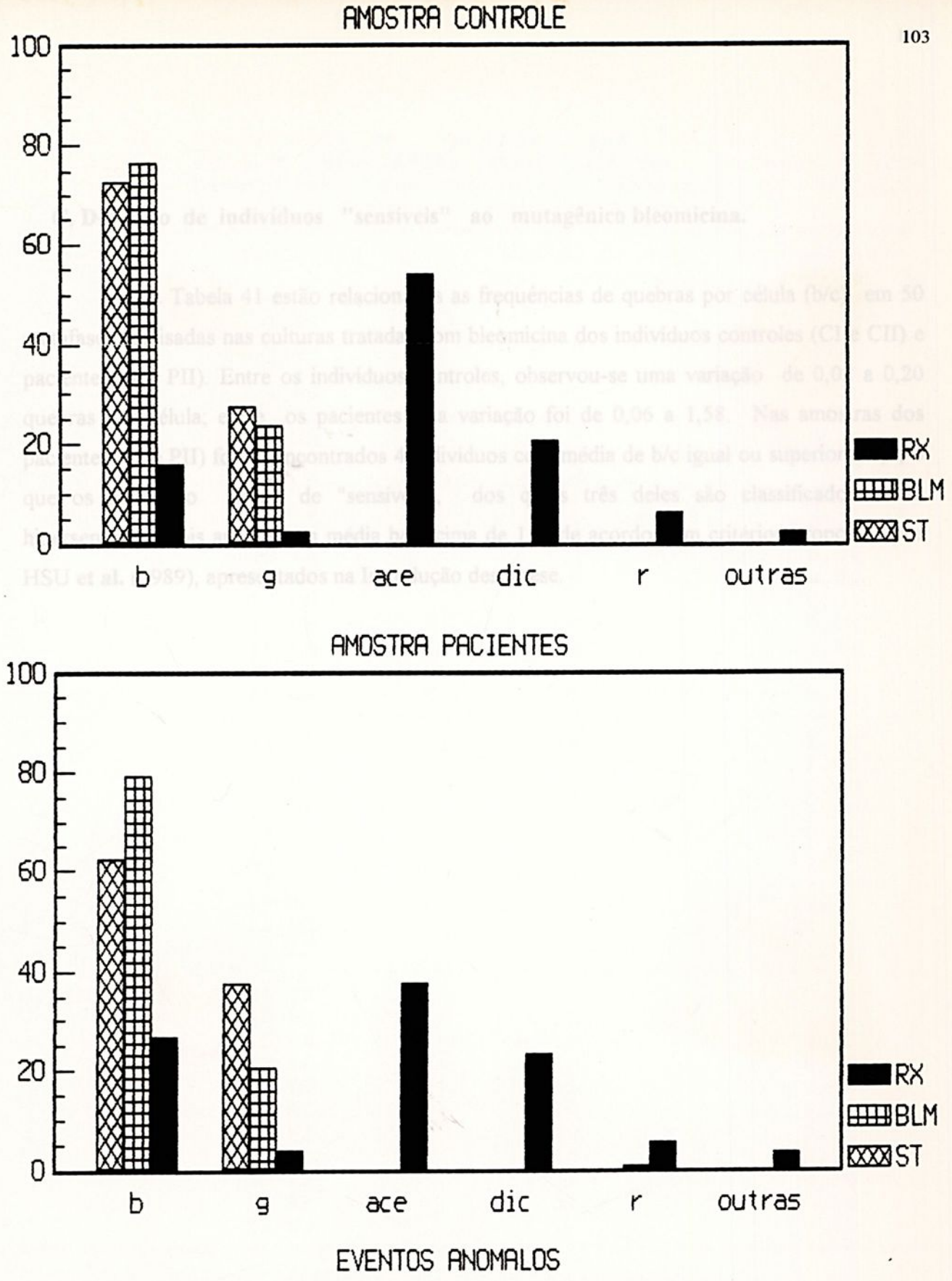


Figura 54. Representação gráfica das frequências percentuais dos tipos de eventos anômalos nos diferentes tratamentos das amostras CII e PII. b = quebras; g = falhas; ace = fragmentos acêntricos; dic = cromossomos dicêntricos; r = cromossomo em anel.

C. Detecção de indivíduos "sensíveis" ao mutagênico bleomicina.

Na Tabela 41 estão relacionadas as frequências de quebras por célula (b/c) em 50 metáfases analisadas nas culturas tratadas com bleomicina dos indivíduos controles (CI e CII) e pacientes(PI e PII). Entre os indivíduos controles, observou-se uma variação de 0,02 a 0,20 quebras por célula; entre os pacientes esta variação foi de 0,06 a 1,58. Nas amostras dos pacientes (PI e PII) foram encontrados 4 indivíduos com média de b/c igual ou superior a 0,8, o que os inclui no grupo de "sensíveis", dos quais três deles são classificados como hipersensíveis, pois apresentam média b/c acima de 1,0, de acordo com critérios propostos por HSU **et al.** (1989), apresentados na Introdução desta tese.

Tabela 41. Frequências de quebras por célula, em 50 células analisadas das culturas tratadas com bleomicina, dos controles (amostras CI e CII) e dos pacientes (amostras PI e PII).

Amostra	Indivíduo	Número de quebras encontradas	Quebras/célula
CI	1 GS	7	0,14
	2 LJ	5	0,10
	3 AN	7	0,14
	4 PB	10	0,20
	5 AD	2	0,04
	6 MR	3	0,06
	7 DB	4	0,08
CII	8 EB	1	0,02
	9 IG	3	0,06
	10 LA	2	0,04
	11 NS	2	0,04
	12 MM	2	0,04
	13 CR	4	0,08
	14 LG	2	0,04
	15 JA	3	0,06
	16 SP	6	0,12
PI	14 SA	54	**1,08**
	16 AS	71	**1,42**
	1 VR	40	**0,80**
	12 MN	79	**1,58**
	8 LC	12	0,24
	29 IM	8	0,16
	9 IT	23	0,46
	19 MP	10	0,20
	32 FR	19	0,38
	2 LS	3	0,06
PII	21 GE	12	0.24
	28 MJ	21	0,42
	5 EB	11	0,22
	3 AP	10	0,20
	7 LT	15	0,30
	17 MS	10	0,20
	18 NA	08	0,16
	20 AB	16	0,32
	33 RF	09	0,18
	10 RP	32	0,64
	23 MU	17	0,34

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

IV. 1. Estudo genético-clínico

A. Sinais Clínicos

A importância das avaliações genético-clínicos em NF deve-se ao fato desta ser uma das doenças hereditárias mais frequentes na espécie humana e de tratar-se de patologia com envolvimento sistêmico e progressivo de suas características, inclusive com risco de desenvolvimento de tumores malignos, comprometimento de funções neurológicas e dificuldade de relacionamento social. Por isso, o diagnóstico precoce, o acompanhamento médico e psicológico, e o aconselhamento genético de indivíduos afetados pela NF são de relevância indiscutível. No entanto, a heterogeneidade genética e expressividade altamente variável dos sinais clínicos da NF tem dificultado o diagnóstico seguro, principalmente em paises ainda subdesenvolvidos, nos quais a população apresenta nível socio-econômico e cultural baixo e os recursos humanos e materiais disponíveis na área de saúde são bastante escassos.

A literatura sobre NF é bastante extensa, principalmente em estudos clínicos. A grande maioria tem mostrado a dificuldade no diagnóstico, em especial na primeira década de vida do indivíduo, e muitos têm ressaltado a importância e dificuldade da classificação da NF em tipos.

Acredita-se que pelo menos um milhão de pessoas em todo o mundo seja portadoras de NF (RICCARDI, 1989; PULST, 1990). A maioria das publicações em NF é referente a pacientes dos EUA, cuja população de afetados por NF é estimada em 100 mil indivíduos (FRANK-STROMBOR, 1992). O estado de São Paulo apresentava população estimada de 31 milhões de habitantes no último censo (IBGE, 1991). Portanto, só nesse Estado, a estimativa teórica é de que haja cerca de 10 mil indivíduos com NF. Contudo, encontrou-se na literatura, a nível nacional, apenas um estudo clínico em pacientes com NF, realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Departamento de Dermatologia, por SADDY **et al.** (1985), no qual foram avaliados onze pacientes, três deles através de informações obtidas de prontuário médico e necrópsia.

SCRIMGEOUR e SEN GUPTA (1988), VARNHAGEN **et al.** (1988), KOUL **et al.** (1989) e WEYMING **et al.** (1991) não encontraram diferenças das manifestaçoes da NF quanto aos parâmetros sexo, grupo étnico e influências regionais. Dos casos investigados no presente estudo, 58% dos pacientes foram do sexo feminino e 42% do sexo masculino, 57% eram caucasóides e 43% eram negróides (pardos claros ou escuros), provenientes da região noroeste do estado de São Paulo.

A amostra investigada apresentou 22 famílias nas quais observou-se recorrência da NF, como mostram os heredogramas nas Figuras de número 6 a 27, e a condição ocorreu como caso único em sua genealogia em 21 casos. Isto significa que 48,8% dos indivíduos apresentaram mutação nova.

A taxa de mutação do gene NF1 tem sido considerada uma das mais altas da espécie humana (HUSON **et al.**, 1989; McKUSIK, 1992) estimada em 10^{-4} por gameta e por geração, 100 vezes maior do que a taxa média de mutação para um único locus (LISTERNICK e CHARROW, 1990). De acordo com RICCARDI e EICHER (1986) e NARCHUK e COLLINS (1994), 50% dos pacientes portadores de NF apresentam mutação nova. No entanto, há algumas restrições em relação a estimativa dessa taxa de mutação e das frequências de mutações novas. Em primeiro lugar deve-se considerar a heterogeneidade, pois a condição pode derivar de proporção significativa de mutações não alélicas. Podem também ocorrer mutações somáticas pós-zigóticas e fenocópias, elevando a taxa de mutação. Outros aspectos que podem contribuir para valores elevados da taxa de mutação são falhas no diagnóstico, desconhecimento de outros membros afetados na genealogia por precariedade na investigação, ocorrência de mosaicismo gonadal nos pais ou translocações cromossômicas envolvendo a banda 17q11.2, que podem levar a falsa interpretação nesse caso de uma mutação nova, como discutido por HOO (1984) e RICCARDI (1992).

As características clínicas foram classificadas por HUSON (1994) como "major", "minor" e "complicações associadas". As "major" são específicas de NF, aparecem na grande maioria dos afetados e são a base dos critérios diagnósticos da National Institutes Of Health (NIH, 1988). São constituídas por MCCL, sardas axilares, neurofibromas periféricos e nódulos de Lisch. As caracteristicas "minor" são também específicas de NF e aparecem em alta frequência nos afetados, mas não são utilizadas como critério diagnóstico. São definidas como "minor" as características macrocefalia e baixa estatura. As definidas como "complicações" são as demais características que envolvem o sistema nervoso, esquelético, genitourinário, endócrino, cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, hematopoiético e a pele.

As MCCL são as primeiras manifestações da NF1, na maioria dos casos são óbvias ao nascimento, tendem a aumentar em número e definição no primeiro ano de vida e param de aumentar na idade adulta (HUSON **et al.**, 1988; RICCARDI, 1992; HUSON, 1994).

Histologicamente tanto a pigmentação macular como as sardas da NF consistem na deposição anormal de melanina na camada basal e apresentação de macromelanossomos pelos melanócitos (SADDY **et al.**, 1985; SLATER **et al.**, 1986). A presença dessas manchas em crianças é a mais importante manifestação que pode levar a um diagnóstico precoce (WITERHOUSE, 1966; BURWELL **et al.**, 1982; MARTUZA **et al.**, 1985), facilitando sobremaneira o aconselhamento genético. No entanto, RICCARDI (1980) já ressaltava que

apesar das MCCL múltiplas serem importantes, não são necessárias nem suficientes para firmar o diagnóstico de NF.

As MCCL tem sido detectadas em pacientes com NF em frequências variando de 82% a 100%. BRASFIELD e DAS GUPTA (1972) detectaram-nas em 98,2% de 110 pacientes investigados. SAMUELSSON e AXELSSON (1981) obtiveram-nas em 95% de 96 pacientes pesquisados. DUNN (1987) encontrou MCCL em 99,6% de seus pacientes. HUSON **et al.** (1988) detectaram-nas em 82% de 22 casos que tinham surgido desde o primeiro ano de vida, de acordo com relato dos pacientes, e RICCARDI (1992) observaram MCCL em 99,6% de 943 indivíduos pesquisados. Outros investigaram tal característica apenas em crianças e encontraram frequências semelhantes. FEINMAN e YAKOVAC (1970) relataram que 89% das crianças avaliadas apresentavam MCCL nos primeiros anos de vida e CRAWFORD (1986) detectou-as em 89% de 116 crianças investigadas. No presente estudo encontrou-se MCCL em 100% dos 17 indivíduos de dois anos a 17 anos e em 98% dos 50 indivíduos com 18 anos ou mais.

O tamanho das MCCL varia de menos de 10 mm até mais de 50 cm (RICCARDI, 1992; HUSON, 1994). Nos casos de tamanho muito pequeno, é difícil a diferenciação entre MCCL e sardas (por exemplo, Figura 28, caso 1-JR). Neste trabalho, a maioria das MCCL era menor do que 10 cm. A maior MCCL observada no presente estudo em criança apresentou tamanho de cerca de 8 x 22 cm, e em indivíduo adulto tinha aproximadamente 32 x 35 cm. A literatura não tem mostrado qualquer significado clínico dessa variação, assim, não parecendo haver diferença na manifestação da patologia em indivíduos com MCCL pequenas ou grandes.

A presença de seis ou mais MCCL com cerca de 1,5 cm de diâmetro é um dos critérios da NIH (1988) para diagnóstico da condição. No entanto, no presente estudo, o caso 27-MT (Figura 36) mostrou apenas duas MCCL que apareceram próximo aos 20 anos de idade, mas foi considerado como afetado pela doença, pois apresentou também um neurofibroma plexiforme que surgiu aos 27 anos, com crescimento progressivo rápido. Situação semelhante em relação as MCCL foi observada também nos casos 25-EF e 42-CP. Todavia, o caso 25-EF apresentou concomitantemente nódulos de Lisch, confirmando assim, o diagnóstico de NF1. Tal caso foi interessante, pois o paciente foi convidado a comparecer no Serviço de Genética devido a ter tido diagnóstico histopatológico de neurofibroma em biópsia de uma pequena lesão em face há dois anos. O paciente não havia sido informado do resultado e, na época, disseram tratar-se de um cisto, assim ele ficou "assustado" quando lhe foi explicado o motivo do convite. Fenotipicamente ele não apresentava sinais da NF, mas concordou em fazer os exames e avaliações, os quais revelaram tratar-se de NF1, com expressão muito leve e tardia.

O caso 42-CP também apresentou história semelhante ao 25-EF. A paciente procurou o Serviço de Genética para levar o filho, que foi encaminhado pela Neurologia com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e fácies atípica. A avaliação da criança (42-RS) revelou MCCL com frequência "baixa", nódulos de Lisch bilateralmente com frequência

"baixa" e RM leve, confirmando diagnóstico de NF1. A mãe apresentava uma lesão em joelho, que relatou ter surgido aos 32 anos de idade, sugestiva de neurofibroma subcutâneo, poucas MCCL em tronco e membros e a avaliação de QI foi médio inferior. Foi realizada biópsia da lesão com diagnóstico de neurofibroma. Assim, a paciente também foi diagnosticada como NF1, com expressão muito leve e tardia do sinais da NF, diferentemente do seu filho.

As MCCL ocorrem em qualquer parte do corpo com exceção do couro cabeludo, sombrancelhas e sola dos pés (RICCARDI, 1992) Contudo, em algumas regiões elas só foram referidas muito raramente, como na palma das mãos (YESUDIAN **et al.**,1984) e na glande do pênis (RICCARDI, 1992). No presente estudo, dois pacientes apresentaram MCCL no pênis, o caso 26-JS e o caso 40-TG (Figura 42). A grande maioria dos casos apresentou MCCL com localização difusa (76%) e 16 casos apresentaram-nas em três partes do corpo (24%).

As MCCL foram observadas com frequência "baixa" em 47,1% das crianças e jóvens e em 38,7% dos adultos; com frequência "média" em 35,3% das crianças e jóvens e em 28,6% dos adultos, e com frequência "alta" em 17,6% das crianças e jóvens e em 32,7% dos adultos. Portanto, as MCCL são importantes para o diagnóstico precoce e aumentam em frequência de acordo com a idade. Todavia, MCCL podem aparecer como sinais isolados em indivíduos normais, ou como parte dos sinais em outras doenças, como por exemplo a síndrome de Albright, de Leopard e o xeroderma pigmentoso (FITZPATRICK e MARTUZA, 1986). Assim, é importante o diagnóstico diferencial dessas síndromes e também que sejam avaliados os outros sinais de NF.

As sardas podem manifestar-se ao nascimento, mas são mais comuns na adolescência e idade adulta, apresentam coloração similar as MCCL, mostram tamanho variando de 1 a 3 mm (HUSON, 1994) e também são histologicamente semelhantes a MCCL (JOHNSON e CHARNECO, 1970). Caracteristicamente, esse tipo de hiperpigmentação aparece em NF1 principalmente como sardas axilares (Figura 2, caso 32-ER), e/ou inguinais (Figura 42, caso 40-TG). RICCARDI (1992) relatou outras áreas de ocorrência de sardas, como nas pálpebras, na base do pescoço, nas regiões submamárias, nas dobras de pessoas obesas, na região superior do tronco. Como já referido, muitas vezes é dificil distinguir pequenas MCCL de sardas e, realmente, as sardas axilares são mais fáceis de serem diagnosticadas e mais frequentes (HUSON, 1994). Em função disso, neste trabalho foram pesquisadas apenas sardas axilares. SAMUELSSON e AXELSSON (1981) encontraram sardas axilares em 48% de 96 pacientes investigados. DUNN (1987) encontrou 40% dos pacientes analisados com tal característica, CRAWFORD (1986) considerou-as um achado inconstante e não estimou a sua frequência, HUSON **et al.** (1988) encontraram-nas em 67% da amostra estudada e RICCARDI (1992) em 64% de 761 pacientes. No presente estudo, a frequência de sardas axilares foi alta (82%) e similar em crianças/jóvens e adultos. No entanto, 43% e 50% dos casos de crianças e jóvens foram classificados como com frequência "baixa e média", respectivamente e 40% e 50% dos

casos de adultos foram classificados como com frequência "média e alta", respectivamente. Em 100% dos pacientes, as sardas axilares foram observadas bilateralmente. Assim, tal característica foi importante para o diagnóstico de NF.

A presença de múltiplos neurofibromas é uma característica patognomônica da NF (THOMPSOM, 1991; McKUSIK, 1992). Eles podem originar-se em qualquer nervo, desde o início da coluna dorsal e gânglios espinhais até as menores ramificações, e também nos nervos craniais e seus gânglios (RICCARDI, 1992). A maioria dos neurofibromas constitui nódulos pequenos cor da pele ou levemente violáceos, com textura macia, quase gelatinosa, varia de 10 mm a vários centímetros de diâmetro e apresenta-se em maior número em pacientes mais velhos.

Os neurofibromas surgem após as MCCL (HUSON, 1994) e são usualmente classificados em quatro tipos: cutâneo, subcutâneo, plexiforme difuso e plexiforme nodular (RICCARDI, 1992; HUSON, 1994). Os neurofibromas cutâneos ou dérmicos,ilustrados nas Figuras 4 e 40 (casos 6-AM, 36-RO e 36-MO, respectivamente), movem-se junto com a pele, geralmente são sésseis e pequenos, alguns são pedunculados (Figura 40, caso 36-MO) e raramente causam dor. Os neurofibromas subcutâneos são profundos na derme, pequenos, tem forma ovóide ou esférica, apresentam textura firme (como uma "borracha escolar") e podem causar dor. Os neurofibromas plexiformes difusos são formados por elementos equivalentes aos schwannomas e/ou neurofibromas cutâneos e com poucos elementos dos neurofibromas subcutâneos, envolvem grande extensões de um nervo e tem textura "amolecida". Este tipo apresenta potencial para progressão maligna em neurofibrossarcoma e está ilustrado nas Figuras 3 e 34 (caso 21-GE e caso 23-MU, respectivamente). Os neurofibromas plexiformes nodulares são conjuntos de tumores do tipo nodular, frequentemente causam muita dor e são de dificil ressecção cirúrgica. São mais raros que os plexiformes difusos e também apresentam risco aumentado para progressão maligna em neurofibrossarcomas (WIESTLER e RADNER, 1994) (Figura 36, caso 27-MT).

Os neurofibromas plexiformes podem ocorrer superficialmente, com envolvimento de grandes extensões cutâneas e subcutâneas (por exemplo, Figuras 3 e 34, caso 21-GE e caso 23-MU) ou profundamente, como na região crânio-facial (Figura 2, caso 3-VM), e em estruturas paraespinhais, mediastino (caso 32-ER), retroperitoneal e vísceras, especialmente no trato gastrointestinal.

Quando há envolvimento cutâneo nesses tumores, é bastante comum a hiperpigmentação no local, como observado no caso 21-GE (Figura 3). A hiperpigmentação desses tumores é de coloração mais intensa do que a observada nas MCCL e também pode ser observada hipertricose no local (RICCARDI, 1992; WIESTLER e RADNER, 1994).

A presença de neurofibroma plexiforme está quase que exclusivamente associada a NF (WIESTLER e RADNER, 1994), portanto é uma característica importante para o diagnóstico da NF. Os neurofibromas plexiformes difusos trazem complicações graves aos seus

unesp

portadores, causam problemas estéticos sérios, provocando muitas vezes hipertrofia de todo um membro ou uma grande parte do corpo. Em muitos casos causam dores, intensas dificuldades motoras e paralisias, como encontrado nos casos 3-AP, 3-VM, 9-IT, 12-MN, 16-BS, 20-AB, 21-GE, 23-MU, 27-MT, 39-MB, 41-OR e 42-CP. A Tabela 42 mostra um resumo de casos em que foram realizadas cirurgias para ressecção de neurofibromas, na maioria neurofibromas plexiformes, que estavam comprometendo funções vitais nos portadores. Tais tumores foram observados em 14 pacientes dos 67 analisados (21%). Em 7 deles ocorreram apenas neurofibromas plexiformes e nos outros 7 ocorreram ambos, neurofibromas plexiformes e cutâneos. RICCARDI (1992) encontrou frequências similares desse sinal nos pacientes, enquanto HUSON (1994) referiu a característica em 30% dos pacientes.

Neurofibromas foram detectados em 73% de 22 crianças investigadas por SAMUELSSON E AXELSSON (1981), em 26% das crianças analisadas por CRAWFORD (1986), em 45,4% das crianças com NF pesquisadas por DUNN (1987) e em 17% dos pacientes de HUSON **et al.** (1988). No presente trabalho, neurofibromas apareceram em 65% dos pacientes de 2 a 17 anos. A amostra de crianças (2 a 12 anos) foi pequena, só nove casos, das quais seis apresentaram pelo menos um neurofibroma (66,6%). Assim, apesar da pequena amostra dessa faixa etária, a presença de pelo menos um neurofibroma foi considerada importante para o diagnóstico precoce da NF. Nenhuma dessas crianças tinha hipótese diagnóstica de NF e elas haviam sido encaminhadas ao Serviço de Genética por apresentarem baixa estatura, atraso de desenvolvimento ou dificuldade de aprendizado. Após a verificação da presença de algumas MCCL, foi realizado exame físico mais cuidadoso, o qual revelou a presença de nódulos sugestivos de neurofibroma e, então, foi solicitada biópsia e investigação histopatológica da lesão, sendo confirmado o diagnóstico. Nos pacientes com 18 anos de idade ou mais, detectou-se neurofibromas (cutâneos e plexiformes) em 96% dos casos e, quando não foi considerada a idade, 86,5% dos casos apresentaram a característica. SAMUELSSON E AXELSSON (1981) encontraram neurofibromas em todos os 96 casos analisados. De acordo com os recentes trabalhos de revisão de RICCARDI (1992) e HUSON e HUGHES (1994), neurofibromas foram encontrados, respectivamente, em cerca de 88% e 96% dos casos.

Assim como referido por HUSON **et al.** (1988), RICCARDI (1992) e HUSON (1994), no presente estudo também foram encontrados neurofibromas nas regiões areolares do mamilo em 15% dos casos. As Figuras 34 e 43 (casos 23-MU e 41-OR) ilustram dois desses casos.

A presença de nódulos de Lisch na íris (Figura 5) parece ser uma característica exclusiva da NF (LEWIS e RICCARDI, 1981; FLUELER **et al.**, 1986; ZEHAVI **et al.**, 1986). Há relatos de apenas dois pacientes com nódulos de Lisch que não eram portadores da NF (PURVIN e DUNN, 1994, para referencia). Esses nódulos não causam sintomas clínicos e aumentam progressivamente com a idade. Parecem surgir após as MCCL e antes dos

Tabela 42. Cirurgias realizadas em 17 pacientes com NF para rececção de tumores.

Família	Indivíduo	Tumor	Tamanho	Região	Figura
2	CS	N	10x8 cm	Cervical direita	29
3	AP	N	?	Terço distal posterior do nervo ciático	
		NPl	15 cm de diâmetro	Hipocôndrio esquerdo	
8	LC	?	?	Crânio/parietal esquerda	
9	IT	NPe	7x5 cm	Couro cabeludo	
		NPl (duas vezes)	45x15 cm	Pelve direita	
12	MN	NPl	12 cm de diâmetro	Membro superior direito	
		NPl	?	Axilar direita	
13	MC	N (?)	?	L4 - L5	
15	JP	N (?)	?	L5 - S1	
16	BS	N de meninge	?	Canal medular no nível C2-C3-C4-C5	
17	MS	?	?	Utero	
20	AB	N	?	Cervical	55
21	GE	NPl (oito vezes)	90x50 cm	Membro superior direito	3
23	MU	NPl (três vezes)	30x45 cm	Membro inferior esquerdo	34
27	MT	NPl (quatro vezes)	?	Plexo branquial	36
36	MO	NPe	8x5 cm	Couro cabeludo	40
39	MB	Extra medular	?	C2-C4	
		N (?)	?	Ocular	
41	OR	NPl	3 kg	Membro inferior esquerdo	43
		N	6 cm de diâmetro	Grandes lábios	
42	CP	N	?	Joelho	

N = neurofibroma; NPl = neurofibroma plexiforme; NPe = neurofibroma pedunculado; L = vértebra lombar; S = vértebra sacral; C = vértebra cervical.

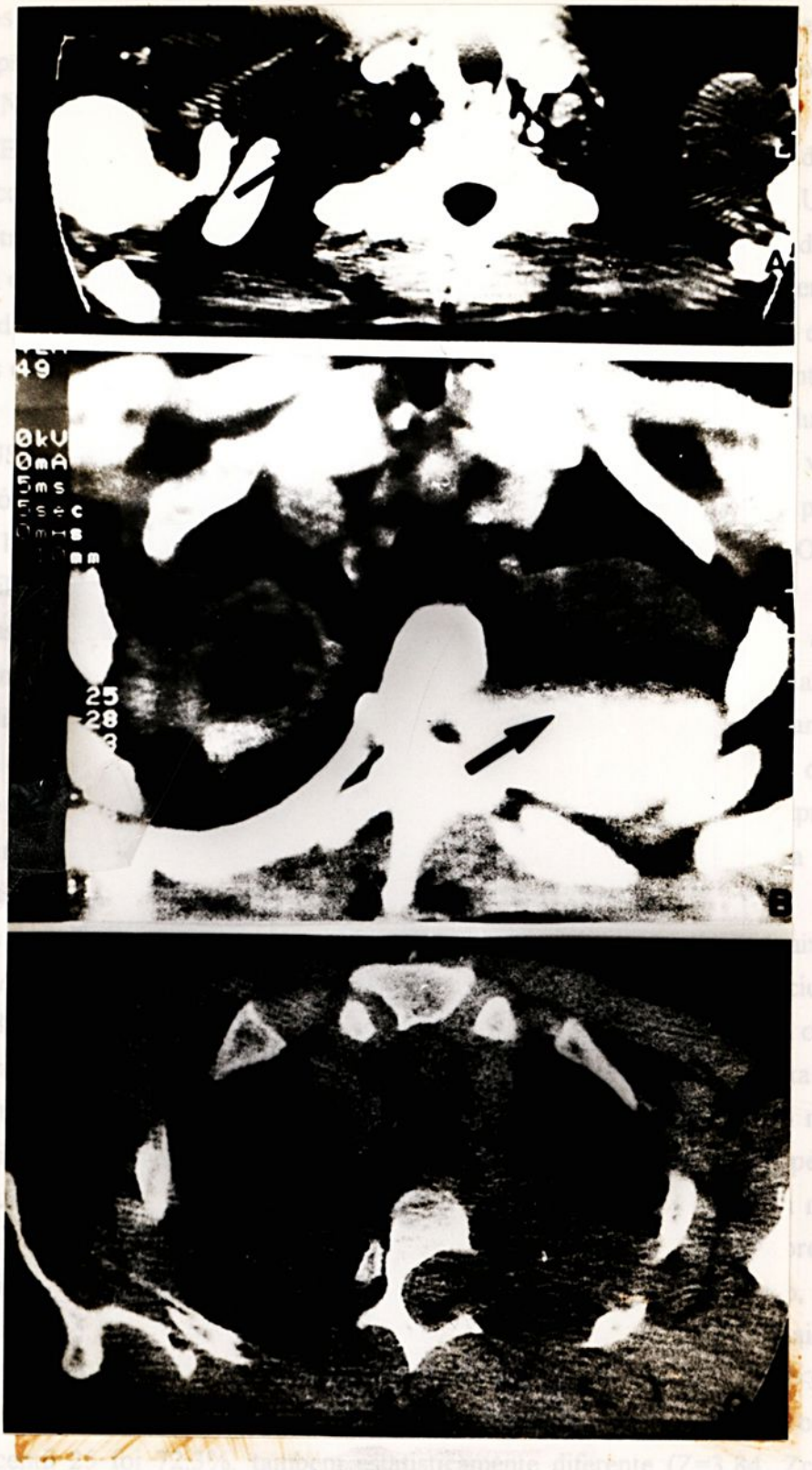


Figura 55. Neurofibroma em região cervical (A) e meningocele torácica (B e C), detectados por tomografia computadorizada na paciente 20-AB.

neurofibromas e são normalmente bilaterais e ocasionalmente unilaterais, especialmente em crianças. A presença e a quantidade dos nódulos de Lisch não estão relacionadas com a gravidade da NF (LEWIS e RICCARDI, 1981).

LEWIS e RICCARDI (1981) encontraram nódulos de Lisch em três de 16 crianças acima de cinco anos de idade e em 92% dos casos com seis anos ou mais. FLUELER **et al.** (1986) encontraram 33% das crianças acima de seis anos de idade com nódulos de Lisch, 87% daquelas com 6 a 12 anos e 100% dos pacientes acima de 12 anos. Semelhantemente, ZEHAVI **et al**. (1986) detectaram nódulos de Lisch em 40% das crianças acima de 10 anos de idade e em 90% naquelas com 11 anos ou mais. Outros dois pesquisadores examinando pacientes, alemães e suiços, com NF também encontraram frequências semelhantes de nódulos na íris (BOLTSHAUSER **et al.**, 1985; MAUTNER **et al.**, 1988). No presente estudo, verificou-se a presença de nódulos de Lisch em 70% dos pacientes pesquisados, em 79% dos 14 pacientes com idades de 2 a 17 anos e em 73% dos 40 pacientes com 18 anos de idade ou mais. Os nódulos de Lisch foram bilaterais em 61,4% e unilaterais em 12,3%.

Esses dados mostram que os nódulos de Lisch ocorrem em 74% a 100% dos indivíduos com NF. A presença ou ausência de nódulos de Lisch pode, então, ajudar a confirmar ou excluir o diagnóstico de NF. Por exemplo, se uma criança com cerca de 11 anos de idade, filha(o) de um indivíduo com NF, apresentar apenas nódulos na íris sem qualquer outro sinal, o diagnóstico de NF poderá ser realizado com razoável segurança. Se esta criança apresentar pelo menos um sinal major da síndrome, por exemplo MCCL ou neurofibroma, a presença de nódulos na íris confirmará com certeza o diagnóstico de NF.

As características definidas como "minor" por HUSON (1994) são baixa estatura e macrocefalia. A baixa estatura tem sido considerada uma característica constitucional da NF1 (HUSON, 1989; RICCARDI, 1992; HUSON, 1994). RICCARDI (1981) foi o primeiro a relatar que uma proporção significativa de pacientes com NF1 apresentava baixa estatura. A frequência de tal característica variou em diferentes estudos. RICCARDI (1992) mostrou que 12% dos indivíduos com NF1 investigados apresentaram estatura abaixo do percentil três, HUSON **et al.** (1988) e HUSON (1994) mostraram que 31,5% a 34% estavam nessa classe. DUNN (1987) considerou com baixa estatura os indivíduos que apresentavam valores abaixo do percentil 25 e incluiu 49% dos seus pacientes nessa categoria. No presente estudo, a incidência de baixa estatura (abaixo do percentil três) foi igual a 44,5%, significativamente maior do que o observado por HUSON **et al.** (1988) e HUSON (1994)($Z=1,71$; $Z_{crítico}=1,65$; $P<0,05$), e por RICCARDI (1992) ($Z=4,00$; $Z_{crítico}=1,65$; $P<0,05$). A frequência de pacientes com estatura abaixo do percentil 25 foi 72,3%, também estatisticamente diferente ($Z=3,84$; $Z_{crítico}=1,65$; $P<0,05$) da observada por DUNN (1987). O peso observado foi proporcional a estatura.

WATERLOO **et al.** (1977) mostraram que a baixa estatura em crianças com cerca de 10 anos de idade estava relacionada com subnutrição. A população de NF estudada por

RICCARDI (1992) foi considerada de classe sócio-econômica média e a presente amostra, apesar de ser enquadrada em classe sócio-econômica baixa, não apresentou casos de subnutrição. Na verdade, os resultados de RICCARDI (1992) sugerem que a estatura baixa em pacientes com NF1 independe de qualquer outro fator hereditário ou econômico. A grande maioria das pesquisas anteriores a 1992 considerava a baixa estatura como uma característica secundária aos problemas ósseos, principalmente a cifoescoliose (WANDER e DAS GUPTA, 1977; DUNN, 1987). Todavia, os pacientes apresentam baixa estatura simétrica e proporcionada, e sua causa ainda é desconhecida, conforme enfatizado por HUSON (1994).

A macrocefalia foi associada com NF pela primeira vez por NORMAN (1972). No primeiro estudo populacional que avaliou o perímetro cefálico (PC) em 27 crianças com NF (WEICHERT **et al.**, 1973), foram encontrados 30% dos indivíduos com PC acima do percentil 98. HOLT e KUHNS (1976) determinaram o PC através de radiografias de crânio em 50 casos de NF, e 23 desses (46%) apresentaram percentil acima de 98. CAREY **et al.** (1979) investigaram 130 indivíduos com NF e 35% apresentaram macrocefalia. Investigando PC em 71 crianças, DUNN (1987) detectou 25% dos pacientes com percentil igual ou acima de 98. HUSON **et al.** (1988) encontraram 45% de 115 casos com macrocefalia e RICCARDI (1992) obteve 29% de 726 casos com PC, acima do percentil 98. Os dados encontrados no presente estudo em relação ao PC são semelhantes ao da literatura ($Z=0,003$; $Z_{crítico}=1,65$; $P>0,05$). Encontrou-se macrocefalia em 37% dos 52 casos ora investigados e a frequência média de pacientes com NF que tinham PC aumentado foi de 35%.

A Tabela 43 mostra um resumo das frequências dos sinais clínicos "major" e "minor" dos pacientes com NF investigados pela literatura e a Tabela 44 (página 126) mostra as frequências de tais sinais no presente estudo.

A morbidade e mortalidade causadas pela NF são decorrentes das "complicações", as quais são numerosas e podem envolver todos os sistemas do corpo. A ocorrência das "complicações" não pode ser prevista pela avaliação dos sinais "major" ou "minor", assim o paciente necessita de avaliações gerais e frequentes para que tais complicações sejam detectadas e para que muitas delas possam ser tratadas.

A avaliação oftalmológica em NF é fundamental para o diagnóstico (presença de nódulos de Lisch e de tumores). A presença de neurofibromas na órbita ocular, schwannomas, gliomas de nervo óptico, meningioma ou glaucoma congênito sugere NF e deve-se pesquisar os outros sinais (PURVIN e DUNN, 1994). Uma avaliação oftalmológica em NF deve envolver tanto a pesquisa de sinais externos como de internos. Na pálpebra podem ser observados desde pequenos neurofibromas e MCCL a tumores graves atingindo toda a órbita ocular, principalmente os do tipo plexiforme, que desfiguram a face do paciente (TENZEL **et al.**, 1977; SPIRA e RICCARDI, 1987). A ptose congênita pode ocorrer, em pacientes com NF, associada

Tabela 43. Frequências dos sinais clínicos "major" e "minor" dos pacientes com NF investigados pela literatura.

Referências	Neurofibromas	MCCL	Sardas Axilares	Nódulos de Lisch	Baixa Estatura	Macrocefalia
FEIMAN e YAKOVAC, 1970		89,0 %				
BRASFIELD e DAS GUPTA, 1972		98,2 %				
WEICHERT et at., 1973						30,0 %
HOLT e KUHNS, 1976						46,0 %
CAREY et al., 1979						35,0 %
LEWIS e RICCARDI, 1981				92,0 %		
SAMUELSSON E AXELSSON, 1981	100,0 %	95,5 %	48,0 %			
BOLTSHAUSER et al., 1985				90,0 %		
CRAWFORD, 1986		89,0 %				
FLUELER et al., 1986				100,0 %		
ZEHAVI et al., 1986				90,0 %		
DUNN, 1987		99,6 %	40,0 %		49,0 %	25,0 %
HUSON, 1988		82,0 %	67,0 %		31,5 %	45,0 %
MAUTNER et al., 1988				90,0 %		
RICCARDI, 1992	88,0 %	99,6 %	64, 0 %		12,0 %	29,0 %
HUSON, 1994					34,0 %	
HUSON e HUGHES, 1994	96,0 %					

ou não a tumores de palpebra ou órbita, pode ser uni ou bilateral, e a base dessa anomalia congênita não é conhecida (HARTNANN **et al.**, 1983; HALL, 1986; PURVIN e DUNN, 1994). HALL (1986) encontrou 9% dos pacientes portadores de NF1 com ptose congênita, DUNN (1987) referiu 4% de 81 crianças analisadas e RICCARDI (1992) também encontrou 4% de portadores deste sinal em 899 pacientes. No presente estudo, três pacientes de 67 investigados, (4,5%) apresentaram ptose palpebral, e a Figura 30 (caso 11-EA) ilustra um desses casos. Assim, a ptose congênita é observada em cerca de 5,5% dos pacientes com NF.

Os neurofibromas oculares plexiformes também ocorrem com frequência média de 5% envolvendo a pálpebra, a órbita ocular e muitas vezes (25% dos casos) toda uma parte da face, causando hemihipertrofia facial. Tais tumores estão associados com alterações ósseas, causando alargamento da órbita, displasia dos ossos temporal, frontal e esfenóide. Em consequência, são referidos dor, visão dupla, glaucoma (50% dos casos), compressão do nervo óptico, coroidose, hipermetropia, hipertelorismo ocular, dificuldade de ressecção cirúrgica, entre outros problemas (JACKSON **et al.**, 1983; SCULLY **et al.**, 1984; JAKOBIEC **et al.**, 1985; KROHEL **et al.**, 1985; RICCARDI, 1992; PURVIN e DUNN, 1994). Esses tumores podem causar a proptose, como observado nos casos 3-VM (Figura 2) e 39-MB.

Semelhantemente ao encontrado no presente estudo, os neurofibromas dérmicos de pálpebra tem sido observados em cerca de 15% dos pacientes com NF (HUSON **et al.**, 1987; RICCARDI, 1992; PURVIN E DUNN, 1994).

O glaucoma pode ser secundário aos neurofibromas oculares, como referido anteriormente, ou congênito, e quase sempre tem manifestação unilateral (GRANT e WALTON, 1968; SATRAN **et al.**, 1980). Apenas RICCARDI (1992) relatou a frequência de tal característica, em seis pacientes de 859 investigados (1%). No presente estudo, detectou-se quatro indivíduos com glaucoma, sendo apenas um caso congênito (2%). Tal investigação é relevante, pois o paciente com glaucoma necessita de acompanhamento oftalmológico constante, e a grande maioria dos casos é secundária a neurofibromas, espessamento dos corpúsculos ciliares ou alterações do tecido fibrovascular, de acordo com o proposto por GRANT e WALTON (1968) e aceito até o presente (PURVIN e DUNN, 1994).

Os gliomas ópticos representam o tipo mais comum de tumor de sistema nervoso central observado em NF1 (LEWIS **et al.**, 1984; LISTERNICK **et al.**, 1989). A frequência de gliomas ópticos em NF tem variado de 10% a 65%, com média de 25% (HOYTEBAGHDASSARIAN, 1969; MILLER **et al.**, 1974; OXENHANDLER, 1979; WRIGHT **et al.**, 1980; BORITERICHARDSON, 1982; RUSH **et al.**, 1982; TENNY **et al.**, 1982; GOULD **et al.**, 1987). LEWIS **et al**. (1984) e LISTERNICK **et al.** (1989) utilizaram técnicas de neuroimagem tanto para avaliar os gliomas sintomáticos como os assintomáticos e demonstraram a prevalência de 15% desses tumores. É interessante ressaltar que apenas 0,4% dos pacientes de LEWIS **et al.** (1984) e 0,2% dos pacientes de LISTERNICK **et al.** (1989)

unesp

apresentaram alguma evidência clínica dessas lesões. As manifestações clínicas de gliomas ópticos são graus variados de diminuição da acuidade visual e, em alguns casos, a presença de proptoses. Neste estudo não foi realizada avaliação específica para detectar tais tumores, mas foi observada diminuição da acuidade visual em 60% dos pacientes e proptose em dois pacientes (4%). Nos pacientes com diminuição da acuidade visual, os vícios de refração detectados foram hipermetropia (27%), astigmatismo (34,6%) e miopia (21%). Tais resultados mostram que a avaliação desses pacientes por técnicas específicas (tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética) para detecção de possíveis gliomas ópticos é relevante.

Há relatos de que os músculos extraoculares podem ter suas funções limitadas por neurofibromas ou outros tumores presentes na órbita (RICCARDI, 1992 para referências), e RICCARDI (1992) também observou disrupção da função dos músculos extraoculares com graus variados de estrabismo, mesmo na ausência de neurofibromas orbitais, em pelo menos 5% dos pacientes. Tal sinal não tem sido investigado por outros pesquisadores. Na presente pesquisa, o estrabismo foi observado em 15,4% dos pacientes, mostrando assim que tal característica deve ser sempre investigada em pacientes com NF e preferencialmente nos estágios iniciais, pois pode resultar em ambliopia.

Outras alterações foram menos frequentemente observadas na avaliação oftalmológica. A presença de catarata é um achado frequente em pacientes com NF2 (KAISER-KUPFER **et al.**, 1989; RICCARDI, 1992). Três pacientes (5,7%) da presente investigação apresentaram catarata, todos com diagnóstico de NF1. RICCARDI (1992) encontrou um paciente portador de NF1 com catarata, em 409 investigados.

A papila oblíqua pode ser encontrada na população geral em frequência baixa (1-2%). Encontrou-se na amostra investigada três pacientes (5,8%) com tal sinal, que pode estar relacionado com diminuição da acuidade visual (DUKE-ELDER e WIBAR, 1961). A coroidose é frequentemente observada na população geral de indivíduos idosos portadores de miopia, o que pode justificar o achado de tal sinal em dois pacientes investigados (29-IM e 31-WM), mas os outros dois que apresentaram coroidose não revelaram miopia (SAUTER **et al.**, 1977). O paciente 23-MU tinha 41 anos de idade, mas o outro (11-EA) tinha apenas nove anos.

O pterígio é um tumor benigno encontrado com frequência na população geral (GRAISON, 1985). São tratados apenas nos casos em que há crescimento ou sintomatologia, dificultando a visão normal. Dos pacientes investigados, 19,2% apresentaram tal característica, que não parece causar problemas para o portador, nem há indícios de estar relacionada com a NF. Um paciente apresentou atrofia óptica (13-MC) provavelmente devido a compressão do nervo óptico por algum tumor, pois tal paciente relatou que foi perdendo a visão depois de adulto e progressivamente e também referiu cefaléias constantes. A atrofia de íris observada no paciente 42-RS pode ser relacionada com possível desenvolvimento de glaucoma, e outros dois pacientes apresentaram papilas com escavação, também relacionada com aumento de pressão

intraocular. A íris hiperplásica do paciente 18-MA foi sugestiva de lesão tumoral, assim como a lesão triangular em retina mostrada pelo indivíduo 16-AS e as lesões de aspecto verrugoso dos pacientes 32-ER, 6-AM e 29-VM. Tais achados reforçam a necessidade de avaliações por técnicas específicas para detecção de tumores oculares nesses pacientes, pois se esses forem diagnosticados, poderão ser tratados e não ocorrerão as alterações secundárias, melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

O sistema esquelético é frequentemente envolvido na NF tanto diretamente, como uma manifestação primária do gene mutante, como indiretamente através de complicações secundárias, principalmente aos neurofibromas. As manifestações esqueléticas da doença pode preceder por muitos anos o aparecimento de neurofibromas. Dessa forma, é importante interrogar sobre a história familial de NF e investigar MCCL, principalmente em crianças com escoliose, pois cerca de 10% das crianças com NF apresentam envolvimento funcional do sistema músculo esquelético, com sérios problemas estéticos (HUSON **et al.**, 1988). O diagnóstico de NF deve ser sempre investigado quando se observar escoliose grave, pseudoartrose de ossos longos, hipertrofia de uma parte do corpo ou uma lesão óssea radiográfica não comum.

A maioria das caracteristicas observadas em exames radiológicos de NF são devidas as displasias mesodérmicas ou tumorais. As displasias mesodérmicas são mais frequentes e incluem ectasia dural e displasia óssea (KRICUN, 1988 e KEATS, 1992).

Alguns pesquisadores relataram a escoliose como a alteração mais comum em NF, com frequência de cerca de 10%, assim como a cifoescoliose com frequências de 10% a 40% (CRAWFORD e BAGAMERY, 1986; KRICUN, 1988; CALVERT **et al.**, 1989; AKABARNIA **et al.**, 1992; KEATS, 1992; RICCARDI, 1992 para referências). No maior estudo populacional sobre NF (RICCARDI, 1992) foram observados 188 pacientes (25%) com escoliose, com ou sem cifose, em 752 indivíduos pesquisados. Na presente amostra observou-se 28,3% dos pacientes com escoliose e 17% com cifoescoliose.

Outra característica associada à NF, observada em radiografia de tórax, foi a meningocele torácica, que aparece como uma massa cística originando-se do mediastino. Dos casos de meningocele torácica diagnosticados, 70% a 80% apresentam NF (KRICUN, 1988; FAIRBANK, 1994 para referências). A paciente 20-AB apresentou tal característica (Figura 55).

A incidência de pseudoartrose congênita na população é 1:250.000 nascimentos e 50% a 90% dos casos são associados à NF (FAIRBANK, 1994). RICCARDI (1992) encontrou 3% de 909 pacientes analisados com pseudoartrose ou com curvatura de tíbia e/ou fibula. No presente estudo não foi detectado tal achado.

A displasia do osso esfenóide é um achado característico de NF (RICCARDI, 1992; FAIRBANK, 1994). No entanto, é considerada rara (FAIRBANK, 1994). Displasias craniofaciais, incluindo também alterações em mandíbula, displasias ósseas das suturas

lambdóide do crânio e alargamento foraminal foram encontradas em 11,7% nos pacientes estudados por RICCARDI (1992). Tais alterações são difíceis de serem observadas em radiografias, e técnicas mais modernas de análise por imagem são recomendadas para seu diagnóstico (FAIRBANK, 1994). A presença de exoftalmia e assimetria facial (na ausência de tumor de face) pode indicar displasias craniofaciais. Os pacientes 11-EA, 16-ZS, 17-MS e 20-AB, do presente estudo, apresentaram tais sinais, no entanto, não foram usadas técnicas específicas para detectá-las.

A presença de peito escavado também tem sido considerada uma característica de NF. RICCARDI (1992) observou 31% de 675 pacientes com tal característica, que todavia não tem sido investigado por outros pesquisadores. Na presente casuística, 17% dos pacientes apresentaram peito escavado (Figuras 31, 33, 38 e 43, casos 16-IS, 22-RB, 33-RF e 41-OR, respectivamente). O geno valgo ou varo foi encontrado em 32% dos pacientes com NF estudados por RICCARDI (1992). Observou-se dois casos (3,8%) com geno valgo no presente estudo.

Outras alterações ósseas podem ser secundárias a neurofibromas, como alargamento do foramem, periostite, alargamento do mediastino, alterações da morfologia do corpo vertebral (CRAWFORD e BAGAMERY, 1986; KRICUN, 1988). Tais achados foram observados nessa amostra com frequências de 11,3%, 5,7%, 3,8% e 5,7%, respectivamente.

Outras alterações que são consideradas variantes da normalidade também foram referidas em pacientes com NF, como espinha bífida, fusão atlanto-occiptal, hemivertebra, espondilolisteses, vértebra de transição lombosacral (KRICUN, 1988 para referências). Na presente investigação, espinha bífida oculta foi encontrada em 9,4% dos pacientes, fusão de vértebras cervicais em 5,7%, vértebra de transição lombosacral em 7,5%, fibroma cortical em 7,5% e apenas um paciente com sela turca em "J". Tais frequências não são diferentes das encontradas na população geral (KRICUN, 1988; KEATS, 1992) e apenas o fibroma cortical e a sela turca em "J" tem sido associados a NF (SCHWARTZ e RAMOS, 1980; RICCARDI, 1992 para referências). Assim, ainda não se sabe o significado de tais achados, os quais podem ser apenas coincidentes nesses pacientes.

Em conclusão, as alterações ósseas mais frequentes foram as escolioses e cifoescolioses, as demais foram menos frequentes. Contudo, algumas dessas alterações, como as pseudoartroses e displasia de esfenóide foram consideradas fortes indicativas de NF pela literatura.

O coração pode ser envolvido nos pacientes com NF que apresentarem neurofibromas na região do mediastino, e outras regiões intratorácicas e torácicas e dentro do próprio coração, pois as células da crista neural contribuem para a estrutura cardíaca (RICCARDI, 1992 para referências). Os pacientes 2-LS, 2-CS e 8-LC apresentaram

neurofibromas no mediastino e o paciente 32-ER na região torácica, detectados por radiografia de tórax (5,7%).

A avaliação eletrocardiográfica (ECG) não mostrou alterações específicas em NF. Alguns achados foram as arritmias cardíacas, extra sístole ventricular (7%) e a taquicardia sinusal (11,6%), que são encontrados na população geral com frequência de cerca de 1%. Essas frequências podem ser maiores após exercícios físicos, consumo de drogas e medicamentos ou induzidas por estresse emocional em adultos (HURST **et al.**, 1990). A taquicardia sinusal fisiológica é encontrada em crianças até a primeira infância (HURST **et al.**, 1990), assim a taquicardia observada no paciente 18-RF (2 anos de idade) sugere ser fisiológica. Dos demais pacientes que apresentaram arritmias, em dois não foram realizadas avaliação psicológica, em seis foi encontrado estado de depressão e em cinco também foi diagnosticada a ansiedade. Portanto, as alterações ECG podem estar associadas com tais distúrbios. As demais alterações ECG observadas foram desvio do eixo elétrico QRS para a esquerda, ou para a direita, sobrecarga do ventrículo direito com alterações difusas da repolarização ventricular, bloqueio incompleto do ramo direito, taquicardia sinusal com bloqueio direcional antero-posterior, zona eletricamente inativa inferior, obtidas na frequência de 2,3%. Tais achados podem ser patológicos e os pacientes foram encaminhados para avaliação por cardiologistas.

Algumas publicações relataram hipertrofia cardiomiopática associada a NF (SALVADORI **et al.**, 1986; SCHRADER **et al.**, 1986; FITZPATRICK e EMANUEL, 1988; NOGAMI **et al.**, 1991). Outros pesquisadores tem referido como características mais comuns a coartação e outras formas de constricção da aorta, artéria renal, artéria cerebral, artérias intra-abdominais e artérias coronárias (RICCARDI, 1992 para referências). No entanto, a frequência de envolvimento arterial em NF tem sido subestimada, pois a maioria das lesões não apresenta sintomas clínicos e quando detectada não tem sido associada a NF, de acordo com as observações de RICCARDI (1992).

A hipertensão foi observada em cerca de 2-6% dos pacientes com NF, pode ocorrer sem causa aparente ou devido a feocrocitomas (1%), coartaçãa da aorta e estenose da arteria renal (HUSON, 1989; RICCARDI, 1992; FERNER, 1994).

Semelhantemente ao observado por RICCARDI (1992) na presente amostra encontrou-se 6% dos pacientes com hipertensão. Em função disso recomenda-se que todos os pacientes com NF façam controle rotineiro da pressão sanguínea e, se detectada hipertensão, sua origem deve ser investigada rigorosamente e rapidamente, pois tal achado tem sido considerado uma complicação grave em NF, a qual pode ser tratada e curada (PELLOCK, 1980; RICCARDI, 1992).

O exame eletroencefalográfico (EEG) apesar de ser considerado uma técnica muito simples, foi indicado por RICCARDI (1992) para a avaliação de pacientes com NF mesmo que estes não apresentem convulsões. RICCARDI (1992) encontrou alterações de EEG em 22% de

seus pacientes e convulsões em 5,6%. HUGHES (1994) obteve 11,7% de 103 casos com convulsões. Na avaliação EEG da presente amostra, 13% dos pacientes exibiram alterações, 7,5% foram do tipo anormalidade paroxística no hemisfério cerebral esquerdo e 5,7% foram do tipo lentificação difusa da atividade cerebral. Apenas um paciente (30-AV) apresentou convulsões e alterações de EEG. Convulsões sem alterações de EEG foram referidos em 9% dos pacientes, enquanto a frequência populacional varia de 2% a 5% (SHORVON, 1990).

A queixa de cefaléia pelos pacientes com NF tem sido referida com frequência de cerca de 10% (RICCARDI, 1981c, 1992), No presente estudo foi estimada em 7,4%. Outros pesquisadores não referiram tal queixa em seus pacientes (RUBENSTEIN **et al.**, 1984; HUSON **et al.**, 1988). As cefaléias podem ser sintomas de tumores cerebrais, gliomas ópticos, doença vascular cerebral e feocrocitomas.

Doença vascular cerebral em NF tem sido relatada na frequência de 4% (HILAL **et al.**, 1971; MOMOSE e NEW, 1973) e RICCARDI (1992) acredita que tais lesões vasculares sejam subestimadas, pois não são realizadas avaliações de rotina devido a natureza invasiva dos testes, e muitas dessas lesões não apresentam sintomatologia. A presença de tais lesões em pacientes jóvens é sugerida por RM, cefaléia constante, convulsões ou hemiparesias (PELLOCK **et al.**, 1980).

Os feocrocitomas podem ou não apresentar sintomatologia e cefaléia, associada com ansiedade acentuada, palpitações, taquicardia, pressão sanguínea elevada, podem ser sinais indicativos dessas lesões e, nesses casos, são indicados procedimentos diagnósticos básicos (RICCARDI, 1992). O paciente 13-MC do presente trabalho apresentou cefaléia constante, pressão sanguínea e ansiedade elevadas, taquicardia e alteração em ECG. Assim, a pesquisa de cefaléia tem sido considerada importante.

Pacientes com NF podem também apresentar cefaléia como resultado da ansiedade e depressão causadas pela doença (HUGHES, 1994). Dos cinco pacientes com queixa de cefaléias constantes, três apresentaram ansiedade e depressão e tais parâmetros não foram avaliados nos outros dois casos (19-MP e 39-MB).

A constipação intestinal ocorre em cerca de 10% de adultos e crianças com NF, devido a displasia e desorganização da camada muscular e do plexo de Auerback do cólon (RICCARDI, 1981c, 1992). Dos pacientes investigados na presente amostra, quatro (6%) apresentaram queixa de constipação. Embora tal problema possa algumas vezes ser amenizado com dietas alimentares, RICCARDI (1992) tem recomendado atenção por parte dos clínicos durante toda a vida desses indivíduos.

Anormalidades menstruais tem sido referida na literatura como uma consequência de neurofibromas uterinos (BRASFIELD e DAS GUPTA, 1972; RICCARDI, 1992). No presente estudo foram tratados como problemas ginecológicos, quando a paciente apresentava alguma queixa, portanto tais problemas não foram investigados em todas as pacientes. Tais queixas

apareceram na frequência de 7,4% e foram referidas como sangramento menstrual anormal em quatro pacientes e presença de neurofibroma em grandes lábios em uma paciente (41-OR).

Ha alguns relatos de aumento das características da NF associadas com a gravidez, principalmente o número e tamanho de neurofibromas dérmicos (GINSBURG **et al.**, 1981; RICCARDI, 1992). Na amostra estudada, três pacientes referiram aumento de neurofibromas durante a gravidez e nos demais casos as pacientes não souberam precisar a infromação. RICCARDI (1992) relata que 70% das mulheres referiram tal associação e MARTUZA e OJEMANN (1982) sugeriram que a manipulação hormonal pode ser uma possível opção terapêutica a ser investigada. EVANS **et al.** (1992) não encontraram evidências de efeito deletério da gravidez. RIOPELLE **et al.** (1984) avaliaram os níveis do fator beta de crescimento nervoso (NGF) realizado no plasma de quatro mulheres durante e após a gravidez e não encontraram qualquer alteração.

Outros tipos de complicações associadas a NF são o retardo mental e as alterações psicológicas, segundo RICCARDI (1992). Tais problemas apresentam três possíveis origens. Em primeiro lugar, pode ser que ainda se desconheça dados referentes à fisiopatologia, manifestações e evolução da doença (ESCALONA, 1982; EGBUONU e STARFIELD, 1982; KELLY **et al.**, 1989; BEITER **et al.**, 1991). Em segundo, pode ser que tais complicações sejam consequência das características específicas da NF no nível psicossocial, pois os tumores causam problemas estéticos, as alterações ósseas são deformantes e ocorre baixa estatura. Em terceiro lugar,pode ser que a mutação do gene NF1 contribua diretamente para esse tipo de distúrbio da função celular, dentro do próprio cérebro.

Os resultados de avaliações sobre esses aspectos são escassos e não permitem conclusões, mas tem sido feitas algumas generalizações. Riccardi e Eicher, em 1986 (cf. FERNER, 1994), encontraram 8,4% de 203 pacientes com retardo mental (RM), comparados com cerca de 3% da população geral. RICCARDI (1992) referiu 6% de RM e FERNER (1994) encontrou 8% de 103 pacientes com RM. Os dados da presente amostra mostraram RM em 43,3% de 30 pacientes investigados, sendo 3,3% com RM moderado e 40% com RM leve. O QI limítrofe (QI=70-85) foi observado em 20% dos casos, o QI médio inferior (QI=85-90) em 23,4% e o médio (QI=90-110) em 13,3% dos pacientes investigados. Portanto a frequência de RM em NF observada neste estudo foi significativamente diferente ($Z=477,8$; $Z_{crítico}=1,65$; $P<0,05$) da observada na literatura. A amostra avaliada apresentou nível sócio econômico mais baixo do que a da literatura e apesar do teste aplicado em larga escala na população brasileira, ainda necessita de normatização para esse nível da população, o que talvez possa ter tido alguma influência nos resultados. Tal achado mostra também a importância do trabalho realizado pelas institutições de NF, pois o paciente recebe assistência completa e multidisciplinar propiciando um melhor desenvolvimento, inclusive o intelectual.

A dificuldade de aprendizagem tem sido encontrada com frequências altas nos pacientes com NF1. Na população geral cerca de 6-9% das crianças apresentam dificuldade de aprendizado (FERNER, 1994). Em NF1, esta condição tem sido estimada com frequência de 40-68% (ELIASON, 1986, 1988; WADSBY **et al.**, 1989; RICCARDI, 1992; FERNER, 1994).

Também foram encontrados problemas visuais espaciais e perceptivos (56%), de memória (60%), de deficiência de habilidade de planejamento e organização em pacientes com problemas espaço -visuais de coordenação motora sem problemas neurológicos ou tumores de sistema nervoso central (28-43%), de linguagem (45%) e de comportamento (5-30%), assim como problemas psiquiátricos, caracterizados como doença mental (33%) e de atraso de desenvolvimento (35%) (ELIASON, 1988; DUNN e ROOS, 1989; SAMUELSSON e SAMUELSSON, 1989; SAMUELSSON E RICCARDI, 1989a, 1989b; WADSBY **et al.**, 1989; RICCARDI, 1992; FERNER, 1994)

Em 30 pacientes do presente estudo foram realizados testes específicos, relacionados no capítulo de Material e Métodos, para avaliação do seguintes distúrbios psicológicos: retardo mental, déficit perceptivo motor (DPM), indícios de comprometimento neurológicos (ICN), depressão, ansiedade e déficit de atenção por hiperatividade (DDAH). A grande maioria apresentou disfunções neurológicas, caracterizadas como DPM em 96,7% dos casos e como ICN em 76,7%.

A depressão foi considerada patológica (depressão maior-DM) em 85,7% dos casos, sendo leve em 17,9%, moderada em 57,1% e severa em 10,7%. A ansiedade transitória foi observada em 90% dos pacientes e a ansiedade estável em 83,3%, sendo a ansiedade considerada leve em 3,3% dos casos, moderada em 26,7% e alta na maioria dos casos (53,3%). Os resultados estão de acordo com a literatura sobre depressão e ansiedade frequentemente encontradas em pacientes portadores de patologias orgânicas ou mentais crônicas (TAYLOR e ASPINWALL, 1990), apesar de FERNER (1994) não ter encontrado frequência aumentada de ansiedade e depressão nos pacientes com NF por ele estudados. Por outro lado, RICCARDI (1992) relatou frequência de doença mental em 33% de 69 pacientes investigados. No presente estudo não foi pesquisado especificamente tal distúrbio, mas a ansiedade e depressão são alguns dos problemas detectados em indivíduos com doenças mentais ou psiquiátricas.

Os sinais de DDAH, na presente amostra, foram ausentes em 6,7% dos pacientes e apareceram em 93,3%. No entanto, 73,3% mostraram sinais de DDAH (sinais de 1 a 7) mas não apresentaram o distúrbio. Dos 20% com DDAH (que apresentaram sinais de 8 a 11), em 13,3% o quadro foi considerado leve e em 6,7% foi considerado moderado. Tal achado juntamente com as demais alterações psicológicas podem estar associados com dificuldades de aprendizagem e desempenho escolar, pois, na presente amostra, somente 4,5% completaram o primeiro grau, 5,9% completaram o segundo grau e apenas um paciente (1,5%) fez o curso superior. Na literatura a dificuldade de aprendizagem dos pacientes com NF tem sido referida

unesp

com frequências variando de 40% a 68% (ELIASON, 1986, 1988; WADSBY **et al.**, 1989; RICCARDI, 1992; FERNER, 1994). Porém, para que tal relação possa ser estabelecida, pesquisas na área precisam ser feitas, já que dificuldade de aprendizagem e escolarização são processos altamente complexos e mantidos por diversos fatores.

SAMUELSSON e SAMUELSSON (1989) e SAMUELSSON e RICCARDI (1989a) mostraram que a maioria dos pacientes com NF exerce atividades ocupacionais que requerem pouca ou nenhuma habilidade específica, mas afirmaram que tais limitações não são necessariamente consequências da mutação do gene NF1. Nesta amostra encontrou-se resultado semelhante, pois apenas 1,5% dos adultos exercia função que exigia melhor qualificação profissional (técnico eletricista, motorista, guarda noturno e bancário).

Assim, a avaliação psicológica precoce completa e o acompanhamento psicológico, educacional e vocacional, com programas de habilitação, poderá melhorar significativamente o desempenho da maioria dos pacientes com NF.

Resumindo, além das características clínicas mais importantes, ou "major", as classificadas como "minor" ou "complicações" também requerem investigação rigorosa e frequente, pois podem auxiliar o diagnóstico e a classificação em tipos, assim como sua detecção poderá evitar complicação secundárias à doença e provavelmente possibilitará o tratamento e/ou cura da manifestação detectada, melhorando sensivelmente a qualidade de vida do paciente.

Assim, o presente estudo sugere que outras características, além das apontadas como "major" pela literatura, sejam consideradas importantes na avaliação do paciente com NF, como as alterações psicológicas, ósseas e oculares, as quais foram observadas em mais de 75% dos pacientes. A Tabela 44 mostra a classificação dos sinais clínicos investigados nesta pesquisa em classes de frequência, podendo-se observar desde os mais frequentes aos menos frequentes. A pesquisa desses sinais é simples e de fácil acesso à grande maioria dos profissionais da área de saúde. Portanto, não há justificativas para a ausência de diagnóstico de NF em nosso estado, e nem em paises ainda não completamente desenvolvidos.

B. Classificação em tipos

Utilizou-se a classificação em tipos proposta por RICCARDI (1982), pois foi a mais abrangente, a mais amplamente abordada pela literatura e por tratar-se do pesquisador com maior número de casos investigados de NF até o presente, o qual tem avaliado todos os sinais apresentados por essa patologia.

A grande maioria das considerações já mencionadas neste trabalho refere-se a NF clássica ou do tipo 1 (NF1), que é essencialmente a entidade descrita por von Recklinghausen em 1882 (CRUMP, 1981) e compreende cerca de 90% dos casos de NF. Na presente casuística, 60 casos (89,6%) foram classificados como NF1 e em 21 famílias observou-se recorrência familial,

unesp

Tabela 44. Frequências dos sinais clínicos nos pacientes com NF.

Classes de frequências	Sinais clínicos	Frequência (%)
F ≥ 75%	MCCL	98,5
	Neurofibromas	86,5
	Sardas axilares	84,8
	Alterações oculares	84,6
	Alterações ósseas	75,5
	Alterações psicológicas	100,0
50% < F < 75%	Nódulos de Lisch	70,0
	Baixa estatura (P < 10%)	57,5
25% < F ≤ 50%	Retardo mental	43,4
	ECG	30,2
	Macrocefalia	36,6
F ≤ 25%	EEG	13,2
	Convulsão	9,0
	Cefaléia	7,4
	Problemas ginecológicos	7,4
	Hipertensão	6,0
	Constipação intestinal	6,0
	Ptose palpebral	6,0

todas com padrão de herança autossômico dominante, conforme heredogramas apresentados nas Figuras 6 a 27.

A NF2, também denominada NF central ou acústica, não foi observada na presente casuística. A NF3 ou tipo misto, mostra características da NF1 e NF2. As manifestações de NF1 já foram amplamente discutidas e as de NF2 incluem, neuromas acústicos uni ou bilaterais, tumores de sistema nervoso central (meningiomas, gliomas, neurofibromas e schwannomas), opacidade lenticular subcapsular e calcificação cerebral (SHORT **et al.**, 1994). Na presente casuística, encontrou-se um caso que se enquadrou no tipo NF3. A paciente 24-LB (Figura 35), ao primeiro exame apresentava 59 anos de idade, o estudo da genealogia revelou um aborto e um natimorto e não mostrou caso semelhante. O exame clínico revelou múltiplos neurofibromas pequenos (frequência média) e sardas axilares bilateralmente, características típicas de NF1, assim como poucas MCCL, surdez, opacificação ocular, glaucoma, dificuldade acentuada para enxergar, fraqueza muscular e tumores acústicos bilaterais (laudo da tomografia computadorizada), que são sinais observados em NF2. A avaliação oftalmológica não revelou nódulos de Lisch.

De acordo com RICCARDI (1992), os pacientes com NF3 não apresentam as outras características típicas de NF1, como os nódulos de Lisch, estatura baixa, dificuldade de aprendizado e peito escavado. MARTUZA e OJEMANN (1982) também diagnosticaram como NF3 um indivíduo com neuromas acústicos bilaterais, mais do que seis MCCL, um neurofibroma plexiforme e múltiplos neurofibromas dérmicos, não apresentou nódulos de Lisch e nem recorrência familial. MICHELS (1989) também identificou um paciente com NF3 e propos que tal tipo possa representar uma forma alélica de NF1. Outros relatos de NF3 tem sido feitos (RICCARDI, 1992; VISKOCHIL e CAREY, 1994 para referências).

O tipo NF4, ou NF variante, inclue os vários fenótipos de NF que não se enquadram nos tipos NF1, NF2 e NF3, por alguma razão ainda não conhecida. Tais indivíduos apresentam os sinais típicos da NF (NF1 ou NF2) e outros adicionais. RICCARDI (1992) considera tal classificação necessária do ponto de vista investigativo e do manejo clínico desses pacientes, pois alguns casos com múltiplos neurofibromas e MCCL, com ou sem outros tumores derivados da crista neural, são tão obviamente diferentes dos outros pacientes com NF que, pelo menos, deve-se tentar agrupa-los numa categoria alternativa. Considera, também, que inclui-los automaticamente em NF1 poderá provavelmente atrapalhar os futuros estudos de ligação, distorcer a história natural de NF1 descrita, levando a uma subestimação da probabilidade de certas complicações na NF e superestimação de outras. E, também, o conhecimento de formas variantes permite um cuidado com a saúde do paciente de forma mais realista e individualizada, pois nem todos os pacientes com NF tem a mesma doença. Além disso, o reconhecimento de NF4 respeita o fato de que nem todos os pacientes com o mesmo fenótipo tem o mesmo

genótipo e tende a sugerir que a diversidade de genótipos seja maior do que um mero alelismo à consideração adicional de loci gênicos múltiplos e fenocópias.

No presente estudo não foi constatado caso de NF4, alguns pacientes apresentaram alguns sinais atípicos, principalmente na face, mas esses sinais não foram considerados "fortes" o suficiente para incluir tais pacientes em outro tipo. O paciente 11-EA (Figura 30) mostrou assimetria facial importante com hipotrofia da região esquerda, ptose palpebral em olho direito, estrabismo, pavilhão auricular malformado, de implantação baixa e em abano, apêndice pré-auricular hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, sinofre, fácies triangular, prognatismo, pescoço curto e artralgia crônica, além de outras características típicas de NF1. Na avaliação dermatológica foi constatada hanseniase do tipo virchwviana. A assimetria facial e ptose são encontrados em alguns casos de NF, mas as outras características faciais são atípicas. O presente caso foi encaminhado ao Serviço de Genética devido a face atípica e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor importante, sem referências as múltiplas MCCL e sem hipótese diagnóstica de NF.

O paciente 22-RB (Figura 33) mostrou implantação levemente baixa das orelhas, fendas palpebrais para cima, sinofre, problemas ortodônticos, palato em ogiva, filtro naso -labial longo, retrognatia, hernia umbilical, criptorquidia bilateral, prega simiesca a direita, nevos em tronco, braquidactilia, clinodactilia de quinto dedo bilateral, micropênis, disartria e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor importantes, além das outras características típicas de NF1. O paciente 37-DP (Figura 41) revelou palato ogival, nevo na face, implantação baixa das orelhas, raiz nasal baixa, narinas antivertidas, maxila proeminente, pescoço curto, tórax "em barril", clinodactilia de quinto dedo a direita, baixa estatura acentuada, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e atraso de maturação óssea (de dois anos).

No tipo NF5 ou segmentar, as característica da NF1 estào localizadas em um segmento do corpo, ou seja, as características são unilaterais, de acordo com a classificação de RICCARDI (1982) e são casos esporádicos em suas famílias.

Há um grande número de publicações sobre NF5, muitas diferindo da proposta por RICCARDI (1982), pois são encontradas formas bilaterais e herdadas. ROTH **et al.** (1987) propuseram uma classificação para NF5 em quatro classes: verdadeira, bilateral, familial e com envolvimento profundo. VISKOCHIL e CAREY (1994) propuseram que a NF segmentar seja causada por mutações somáticas do gene NF1 e os padrões clínicos de expressão sejam determinados pelo período em que ocorreu a mutação (inicial ou mais tardio do desenvolvimento embrionário) e pelo tipo celular afetado pela mutação. Os autores sugeriram quatro classes: (1) com característica única e localização única (mutação na crista neural em período mais tardio do desenvolvimento levando a uma característica da doença), (2) com característica única e localização múltipla (mutação na crista neural na fase inicial do desenvolvimento levando a localização distintas de MCCL e neurofibromas), (3) com características múltiplas e localização

única e (4) com características múltiplas e localização múltipla (próprio fenótipo NF1). A Tabela 45 resume informações sobre alguns dos pacientes com NF segmentar, classificados de acordo com essas duas propostas. Dos 28 casos classificados por ROTH **et al.** (1987) como NF segmentar verdadeira, 19 foram considerados por VISKOCHIL e CAREY (1994) como NF segmentar 1´ (característica única/localização única), dois casos não foram considerados NF segmentar, ou seja, enquadraram-se na classe 4´ (características múltiplas/localização múltipla) e os outros sete enquadraram-se na classes 2´ (característica única/localização múltipla) e 3´ (características múltiplas/localização única). Dos seis casos classificados como NF segmentar hereditária, dois foram enquadrados na classe 1´, dois na classe 2´ e dois na classe 4´, e dos quatro casos classificados como NF segmentar bilateral, um foi enquadrado na classe 1´, um na classe 2´ e dois na classe 4´. Assim, seis casos que foram considerados como NF segmentar na classificação de ROTH **et al.** (1987), na classificação de VISKOCHIL e CAREY estes casos foram considerados NF clássica.

A paciente 21-GE (Figura 3) foi enquadrada no tipo NF5. A paciente apresentava 25 anos, tinha três filhos sem qualquer sinal da NF e, ao exame fisico, revelou neurofibroma plexiforme em membro superior direito hiperpigmentado e duas MCCL, uma em abdome e outra em região posterior da coxa direita. Não mostrou sardas axilares e apresentou nódulos de Lisch no olho direito. Tal caso pode ser enquadrado na classe 1 da classificação de ROTH **et al.** (1987) e na classe 3´ da classificação de VISKOCHIL e CAREY (1994).

O paciente 27-MT (Figura 36) também foi enquadrado no tipo NF5, porém nas classes 2 e 3´, de acordo com as classificações acima citadas, respectivamente. O paciente apresentava 43 anos, a avaliação da genealogia não mostrou caso semelhante e os seus dois filhos não apresentavam qualquer sinal da NF. Ele apresentava duas MCCL no dorso a direita e um neurofibroma plexiforme envolvendo todo o plexo branquial direito, já havia realizado quatro cirurgias para ressecção do tumor e ainda continuava com crescimento progressivo e com dor intensa. A avaliação oftalmológica foi normal, não mostrou sardas axilares ou outros sinais típicos da NF1.

Os indivíduos com NF6 manifestam apenas MCCL, ou MCCL associadas com características não específicas, como peito escavado e dificuldade de aprendizado (RICCARDI, 1980, 1981a, 1982). A família 18, indivíduos MA, MF e RF (Figura 32) foram classificados como NF6. Todos os três indivíduos apresentavam MCCL com localização "difusa" e frequência "baixa", sardas axilares com frequência "alta" em 18-MA e 18-MF e "baixa" em 18-RF. O indivíduo 18-MA revelou apenas fusão dos corpos vertebrais C2-C3 na avaliação radiológica, o indivíduo 18-MF não mostrou alterações e o indivíduo 18-RF revelou encurtamento das falanges medianas e distais do segundo e terceiro dedos da mão direita, idade óssea de um ano e seis meses (idade cronológica de dois anos e seis meses), a escanometria de membros superiores

unesp

Tabela 45. Estudos em pacientes com NF segmentar (NF5) mostrando as principais características observadas e as classificações propostas por ROTH et al. (1987) e VISKOCHIL e CAREY (1994).

Autor	Local.	ND	NP	MCCL	Sardas	NL	Recorrência	ROTH et al. (1987)				VISKOCHIL e CAREY (1994)			
								1	2	3	4	1'	2'	3'	4'
MILLER e SPARKES (1977)	D	+	–	+	+	NE	–	+						+	
	E	+	–	+	+	NE	–	+							+
UHLIN (1980)	D	+	–	–	–	NE	+	+				+			
RUBENSTEIN et al. (1983)	E	+	–	–	–	–	+			+			+		
	E	+	–	–	–	–	+			+		+			
	D	+	–	–	–	NE	+			+		+			
	?	–	–	+	+	NE	+			+			+		
WELEBER e ZONANA (1983)	D	–	–	+	–	+	–	+						+	
DAWSON (1984)	D,E	+	–	+	–	NE	–				+				+
	E	+	–	–	–	NE	–	+				+			
TAKIGUCHI e RATZ (1984)	?	+	–	–	–	–	–				+	+			
ORANJE et al.(1985)	E	+	–	–	–	NE	–	+				+			
PULLARA et al. (1985)	D	+	–	–	–	NE	–	+				+			
	E	+	–	–	–	NE	–	+				+			
KOEDIJK (1987)	E,D	+	–	–	–	NE	–				+		+		
RAWLINGS et al. (1987)	E	+	+	NE	NE	NE	NE		+					+	
	D	+	+	–	–	NE	–		+					+	
	D	+	+	–	–	NE	NE		+					+	
	D	–	+	–	–	NE	–		+			+			
ROTH et al (1987)	E	+	–	–	–	–	–	+				+			
	D	+	–	+	–	–	–	+						+	
	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
	?	+	–	+	–	–	–				+				+
STOTTS e STEINMAN (1987)	E	+	–	+	–	–	–	+						+	
CALZAVARA et al. (1988)	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
GRETZULA et al.(1988)	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
JUNG (1988)	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
	E	+	–	+	+	NE	–	+						+	
	E	+	–	+	+	NE	–	+						+	
	D	+	–	–	–	NE	–	+				+			
	E	+	+	–	–	NE	–		+			+			
	D	+	–	–	–	NE	–	+				+			
BOLTSHAUSER et al. (1989)	?	–	+	+	–	NE	+			+					+
	D	–	–	+	+	+	+			+					+
KAPLAN e PESTANA (1989)	E	+	–	+	–	–	–	+						+	
SANCHEZ CANEJO-MIR et al. (1989)	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
JAAKKOLA et al.(1990)	D	+	–	–	–	NE	–	+				+			
SLOAN et al. (1990)	D	+	–	–	–	–	–	+				+			
	E	+	–	+	–	–	–	+							+
SMITH e HEYMANN (1990)	D	+	–	NE	NE	NE	–	+				+			
TRATTNER et al. (1990)	?	+	–	–	–	–	–	+				+			
	E	+	–	–	–	–	–	+				+			

ND = neurofibroma dérmico; NP = neurofibroma plexiforme; NL = nódulos de Lisch; E = esquerda; D = direita; NE = não examinado; 1 = verdadeira; 2 = profunda; 3 = hereditária; 4 = bilateral; 1' = característica única/localização única; 2' = característica única/localização múltipla; 3' = características múltiplas/localização única; 4' = características múltiplas/localização múltipla.

mostrou diferença de 1 cm (membro superior direito menor) e sindactilia cutânea do segundo e terceiro dígitos da mão direita.

Até o presente, foram publicados dados sobre apenas duas famílias portadores de NF6, por RICCARDI (1982, 1992), uma apenas com MCCL e a outra apresentando MCCL, peito escavado e retardo mental. A herança da condição nessas famílias e na do presente estudo era compatível com padrão autossômico dominante.

O tipo NF7, ou NF de início tardio, caracteriza-se pela presença de apenas neurofibromas e na terceira década de vida. Nesse tipo não são observadas MCCL, nódulos de Lisch e a maioria das outras características de NF1. Os neurofibromas podem ser relativamente localizados ou difusos pelo corpo e até o presente nao foram identificados casos herdados (RICCARDI, 1992). Na presente casuística, um caso (35-MG, Figura 39) pode ser enquadrado como NF7. A paciente apresentava 61 anos e ao exame revelou apenas neurofibromas com frequência "baixa" e localização "difusa". A investigação da genealogia não revelou casos semelhantes. A avaliação psicológica mostrou RM leve e presença das outras características psicológicas avaliadas.

RICCARDI (1983) descreveu uma paciente com NF7, a qual também apresentava lupus eritematoso. Outros relatos de casos tem mostrado essa associacao (RICCARDI, 1992 para referências). Esses tipo de NF, de acordo com especulações de RICCARDI (1992) pode representar uma fenocópia parcial de outros tipos de NF, talvez de etiologia infecciosa (viral), mas são necessários estudos adicionais para melhor esclarecimento.

Como já referido na Introdução, a classificação de RICCARDI (1982) não é universalmente aceita, devido a difícil definição e distinção clínica dos tipos NF3, NF4, NF7 e NF8.

Alguns pesquisadores tem descrito um outro tipo de NF, a NF com fenótipo Noonan (ALLONSON **et al.**, 1985; MENDEZ, 1985; OPTIZ e WEAVER, 1985; KAPLAN e ROSENBLATT, 1985; MEINECKE, 1987). No entanto, tal tipo também mostra-se de difícil distinção, pois parece que há uma sobreposição de algumas características de NF1 com as de síndrome de Noonan, conforme descritas na Introdução. Além dessas, outras formas relacionadas com NF foram descritas. A NF gastrointestinal, que manifesta neurofibromas limitados ao trato gastro intestinal, foi descrita em uma família e possivelmente associada com a translocação envolvendo os cromossomos 12 e 14 (HEIMMANN **et al.**, 1988; VERHEST **et al.**, 1988) e foi incluída no catálogo Mendelian Inheritance in Man (McKUSICK, 1990). Também tem sido descritas, como relacionadas com a NF, a schwannomatose múltipla, caracterizada por múltiplos schwanomas na pele, cordão espinhal ou ambos, mas sem envolvimento intracranial e a síndrome de Watson, caracterizada por MCCL, estenose pulmonar e RM (HALL e ALLANSON, 1991). Alguns casos dessa síndrome tem sido associados com neurofibromas e nódulos de Lisch (UPADHYAYA **et al.**, 1990).

unesp

Tais achados, portanto, reforçam a heterogeneidade da NF e a problemática em relação a classificação da NF. A mais recente classificação, e ainda não discutida pelos pesquisadores em NF, foi a de VISKOCHIL e CAREY (1994) que propuseram a classificação das "tão discutidas" formas variantes, atípicas ou relacionadas a NF, em duas categorias. A primeira categoria foi denominada "formas alternativas", divididas em: (a) NF mista; (b) NF localizada, subdividida em segmentar, gastrointestinal, espinhal e MCCL múltiplas; (c) schwannomatoses. A segunda categoria foi denominada "formas relacionadas", divididas em: (a) NF/Noonan; (b) síndrome de Watson; (c) carcinomas duodenais/feocrocitomas/NF1; (d) xantogranuloma juvenil/NF1. Assim, a NF1 e NF2 foram consideradas as formas clássicas e as "formas alternativas" da NF1 e NF2 foram definidas como aquelas condições que apresentaram características clínicas de NF1 ou NF2, mas não são "típicas". As "formas relacionadas" de NF1 e NF2 constituem um conjunto de condições que apresentam características clínicas típicas ou clássicas da NF em adição à características "não típicas" da NF1 ou da NF2.

VISKOCHIL e CAREY (1994) sugerem, então, que as "formas alternativas" de NF podem ser causadas por formas alélicas de NF1 e NF2 (incluindo mosaicismo somático), ao passo que etiologia não-alélica das formas variantes, tais como genes contíguos ou vias bioquímicas alternativas, podem contribuir para uma expressão clínica mais extensa das NF variantes. No entanto, para que seja realizada tal classificação, e necessário examinar rigorosamente a variabilidade da expressão clínica das formas clássicas.

A classificação de VISKOCHIL e CAREY (1994), de acordo com o que se conhece até o presente, tem sido a melhor sugestão e apenas estudos moleculares associados com os achados clínicos poderão definir exatamente a classificação em tipos de NF.

Os dados do presente estudo podem ser enquadrados em ambas as classificações, tanto a de RICCARDI (1982) como a de VISKOCHIL e CAREY (1994). Nessa última, o paciente que foi considerada NF7 (35-MG), na classificação de RICCARDI (1982), poderia ser classificado como NF segmentar classe 3, ou seja, uma única característica em vários locais, pois apresentou apenas neurofibromas de localização difusa, por provável mutação somática em fase mais tardia do desenvolvimento. A família classificada como NF6 seria enquadrada na classificação de VISKOCHIL e CAREY (1994) como tipo NF localizada, subtipo MCCL múltiplas.

C. Aconselhamento Genético

A colocação do aconselhamento genético como elemento mais importante para o "cuidado" do paciente com NF e seus familiares foi feita por RICCARDI **et al.** (1978), e tem sido confirmada até o presente (RICCARDI, 1992; HUSON e UPADHYAYA, 1994). O aconselhamento genético é o processo pelo qual o indivíduo ou a família obtem informações

sobre um problema genético real ou possível (HSIA e HIRSCHHORN, 1979). Ele tem como objetivos fazer com que o paciente e a família compreendam os fatos médicos, incluindo o diagnóstico e a evolução da doença, sejam informados sobre os riscos de ocorrência e recorrência da condição, levantar as opções da medicina atual em relação aos possíveis tratamentos e o acompanhamento médico adequado. Além disso, deve oferecer o diagnóstico pré-natal, fornecer opções em relação ao controle reprodutivo, minimizar o sentimento de culpa, a ansiedade e o sofrimento em relação ao problema e fornecer apoio psicoterápico.

Para que seja realizado o aconselhamento genético, o geneticista terá primeiro que realizar o diagnóstico ou confirmá-lo. Deve, também, determinar se há outras condições genéticas segregando com a NF. RICCARDI (1992) e outros tem descrito várias famílias nessa situação, por exemplo, eles descreveram algumas famílias com NF1 e coréia de Huntington. Na presente casuística, também se observou um caso (19-MP) apresentando NF1 e retinite pigmentar, ambas doenças autossômicas.

No aconselhamento genético, o primeiro passo deve ser o estabelecimento de vínculo do geneticista com o paciente, para que esse possa confiar no trabalho do profissional, sentir-se a vontade, ou seja, não ficar constrangido durante as consultas, dar informações precisas (do próprio paciente e da história familial), trazer outros membros da família quando necessário, enfim, para que o paciente colabore com todas as solicitações, permitindo um aconselhamento genético eficaz.

O segundo passo, que é a coleta de dados pessoais e familiais, pode ser realizado de acordo com a ficha padronizada para esse estudo (anexo 1) e, em seguida, deve ser realizado o exame físico detalhado. Após o exame, serão explicados ao paciente as primeiras conclusões e o motivo da realização de cada exame complementar e/ou avaliações de outras especialidades médicas.

A localização do Serviço de Aconselhamento Genético em hospital-escola já é preconizado, pois os pacientes com problemas genéticos sempre necessitam de avaliação e acompanhamento multidisciplinar, os profissionais que trabalham em tais institutições tem interesse científico, há biblioteca especializada para consultas específicas e existem todos os serviços para realização dos exames complementares em um único local. Na verdade, tem sido proposto que os pacientes com NF necessitam de serviço médico ainda mais específico, ou seja, em centros ou instituições só para atendimento de pacientes com NF (RICCARDI, 1992; HUSON e UPADHYAYA, 1994), pois as complicações, já discutidas, atingem todos os sistemas do corpo, e a população de pacientes com NF é muito grande. Em paises desenvolvidos, como os Estados Unidos da América do Norte, Canadá e Inglaterra há pelo menos seis instituições desse tipo, publicações, mostram como devem ser organizadas tais instituições.

unesp

Assim, após a realização de todos os exames e avaliações, é realizado o diagnóstico e, se possível, a identificação do tipo. Isso é importante, pois apesar das controvérsias sobre as classificações, sabe-se que a NF1, NF2, NF3 e a NF6 são formas autossômicas dominantes, a última com um prognóstico benigno, e a NF5 e a NF7 não são herdadas e parecem ser resultado de mutações somáticas.

O passo seguinte é o aconselhamento genético propriamente dito. O aconselhador inicialmente deverá descrever e explicar as características "major" e quando elas aparecem, depois as "minor" e em seguida as complicações, de acordo com a prosposta de HUSON E UPADHYAYA (1994). Outros acreditam que algumas complicações mais graves devem ser omitidas, pois acham que o conhecimento de tais alterações trará um estresse ao paciente e/ou familiares. No entanto, HUSON e UPADHYAYA (1994) acreditam que é melhor para o paciente informar-se corretamente com profissional qualificado do que receber informações exageradamente ou erradamente por meio de jornais, programas de televisão, filmes ou pessoas não especializadas no assunto.

A experiência em atendimento ambulatorial desses pacientes mostrou que a grande maioria dos encaminhados ao Serviço de Genética não tinha diagnóstico confirmado, não tinha recebido qualquer orientação ou acompanhamento periódico, muitos estavam em idade reprodutiva e não sabiam dos riscos de transmissão para a prole. O paciente deve, então, ser esclarecido, inclusive recebendo um relatório escrito em linguagem correta e simples, de que a NF é uma doença hereditária que tem transmissão autossômica dominante com penetrância elevada e expressividade variável. Isso quer dizer que uma pessoa afetada pela NF tem uma chance de 50% de gerar um filho com a doença, que a gravidade do quadro clínico de cada paciente independe da gravidade com que a doença se manifestou no genitor afetado, e que o agravamento no quadro clínico é progressivo. Os parentes em primeiro grau não afetados pela NF1 apresentam o mesmo risco de recorrência da população geral, que é uma chance em 10 mil (a própria taxa de mutação do gene).

Em função dos riscos, o aconselhador deve colocar as alternativas reprodutivas, ou seja, contracepção temporária ou permanente, inseminação artifical por doador, se o paciente for do sexo masculino, fertilização in vitro com óvulo de doadora se a paciente for do sexo feminino. Provavelmente, nos paises com desenvolvimento científico e tecnológico avançado em breve será possível identificar a mutação no gene NF1 no óvulo através de biópsia do corpúsculo polar e, seletivamente, inseminar in vitro somente o óvulo não portador da mutação, ou identificar a mutação em embriões no estágio de quatro ou oito células, com implantação uterina somente dos embriões não-portadores da mutacão. Deve-se, também, levantar a hipótese de adoção. Na opção por gravidez, pode ser recomendado o diagnóstico pré-natal, nos paises onde ele exista, o que não é o caso do Brasil.

unesp

O paciente deve ser informado sobre possíveis tratamentos e a necessidade de acompanhamento médico e psicológico contínuo. O Serviço de Aconselhamento Genético, na verdade, é o ponto de ligação com todas as outras áreas médicas de que o paciente necessita, e tal aspecto é importante para o paciente, pois o geneticista o acompanhará por um tempo prolongado e terá todas as informações, diferentemente das outras áreas médicas que só avaliam ou tratam determinada característica.

É interessante, ainda, que o paciente receba um relatório completo sobre toda a avaliação realizada, resultado, conclusões e informações gerais sobre a NF pois ele tem interesse em saber como está a sua saúde ou o que poderá surgir.

O contato com outros afetados e a atenção de profissionais qualificados também é muito importante para o paciente. A experiência do presente estudo mostrou que o encontro com outros afetados e com psicológos e assistentes sociais na "sala de espera", onde os pacientes ficavam antes da consulta com o geneticista, contribuiu para melhorar a ansiedade e depressão de muitos dos pacientes, pela possibilidade de compartilhar experiências e de esclarecer dúvidas e receber informações. Diversos pacientes relataram que compareciam prazerosamente ao Serviço de Genética, porque se sentiam apoiados pela presença dos outros pacientes e pela atenção dos profissionais.

IV. 2. Estudo citogenético

A literatura sobre a síndrome da neurofibromatose é muito ampla, pois trata-se de uma das mais frequentes doenças hereditárias que afeta a espécie humana (BUCHBERG, **et al.**, 1990,para referências). A grande maioria dessas publicações refere-se a achados clínicos, provavelmente por tratar-se de doença com expressividade bastante variável e por existirem diferentes tipos clínicos de NF. No entanto, há poucos estudos citogenéticos e, também, não há concordância na literatura sobre a frequência de tumores malignos nesses pacientes: alguns pesquisadores relatam frequências mais baixas (3% a 15%) e outros referem que a transformação maligna pode ocorrer em até 40% dos casos, conforme já referido na Introdução.

A instabilidade cromossômica ocorre em várias síndromes genéticas associadas a neoplasias e a frequência de anomalias cromossômicas tem sido um parâmetro eficaz para estimar essa instabilidade. Estudos citogenéticos em metáfases de linfócitos da população normal tem mostrado que a frequência de anomalias cromossômicas espontâneas é baixa (1 - 3%, HSU, 1987), enquanto que, em algumas síndromes de instabilidade cromossômica, como por exemplo anemia de Fanconi, síndrome de Bloom e ataxia telangiectasia, essa frequência pode ser muito alta (até 50%) (ARLETT e LEHMAN, 1978; HSU, 1987). Outras síndromes, como o xeroderma pigmentosum (XP), não apresentam frequência elevada de anomalias cromossômicas espontâneas, mas as células de pacientes portadores de XP são mais sensíveis a irradiação ultravioleta do que as células de pessoas normais, apresentando incidência significativamente maior de anomalias cromossômicas. Essas síndromes associam-se com predisposição ao câncer, dessa forma suportando o conceito de que instabilidade genética e neoplasia são fenômenos relacionados ou, mais especificamente, que a instabilidade genética pode aumentar a probabilidade de oncogênese, induzindo à segunda etapa da tumorigênese (HSU, 1983; HSU, 1986; BIELFELD **et al.**, 1989; PATHAK **et al.**, 1989).

O câncer é o resultado de eventos mutacionais múltiplos em células somáticas e os estudos sobre genética e câncer suportam a hipótese de mutação em duas etapas da carcinogênese (KNUDSON e STRONG, 1972; KNUDSON, 1989). Assim sendo, os indivíduos portadores de lesão genética congênita já nascem com a primeira etapa, e a ocorrência de apenas mais um evento mutacional no gene homólogo pode provocar a malignização de um tipo especial de célula. Por outro lado, indivíduos sem alteração genética precisam de, pelo menos, dois eventos mutacionais, um em cada um dos genes do par, para que ocorra a transformação

unesp

neoplásica (HSU, 1986). Portanto, a taxa alta de mutações devido a alteração genética ou a exposição a carcinogênicos ambientais pode desencadear o processo de malignização.

Os estudos de instabilidade cromossômica em pacientes com NF são escassos e controversos. Em relação as alterações cromossômicas espontâneas, WEBB e HARDING (1977) avaliaram linfócitos de sangue periférico de uma família com NF e não detectaram diferenças nas frequências de quebras e falhas em relação as observadas nos indivíduos controles. Tais resultados também foram obtidos por RICCARDI e MARGOS (1981) em culturas de fibroblastos de pele e tumores de pacientes com NF, e por GRANDBERG-OHMAN **et al.** (1988), em culturas de fibroblastos de pele de cinco indivíduos com NF de uma mesma família. Estes últimos pesquisadores avaliaram também a frequência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) e encontraram frequências médias de TCI abaixo da observada na amostra controle, constituída de 11 indivíduos. HAFEZ **et al.** (1986) pesquisaram a frequência espontânea de TCI em oito pacientes com NF pertencentes a diferentes famílias e 10 indivíduos controle, e também não encontraram diferenças entre as amostras. Assim, na literatura pesquisada, há relato de apenas quatro investigações com a finalidade de avaliar instabilidade cromossômica espontânea, e apenas o estudo de HAFEZ **et al.** (1986) cumpriu critérios importantes para esse tipo de pesquisa, ou seja, tinha tamanho amostral razoável e os pacientes eram de diferentes famílias.

No presente trabalho, foram pesquisadas alterações cromossômicas espontâneas em 21 pacientes com NF (10 indivíduos no experimento I e 11 no experimento II) e 16 indivíduos controles (sete no experimento I e nove no experimento II), todos pertencentes a diferentes famílias. Os resultados mostraram frequências de anomalias cromossômicas espontâneas significativamente maiores em pacientes com NF do que em indivíduos controle, sugerindo que os portadores de NF apresentam instabilidade cromossômica espontânea. Esses achados corroboram a hipótese de que doenças genéticas associadas ao desenvolvimento de múltiplas neoplasias apresentam instabilidade cromossômica e que tais alterações podem ser um dos passos no processo de carcinogênese.

Além de utilizar a frequência de anomalias cromossômicas espontâneas como parâmetro para estimar a instabilidade genética, pode-se também verificar a resposta apresentada a agentes que atuam sobre o DNA. Como já referido anteriormente, há indivíduos que podem apresentar uma instabilidade genética latente, que normalmente não é detectada, mas que pode se manifestar pela frequência de aberrações cromossômicas induzidas por mutagênicos, devido ao acúmulo de lesões do DNA não reparadas, o que reflete um mecanismo de reparo do DNA

unesp

defeituoso (HSU, 1983, SPITZ **et al.**, 1989). A deficiência no sistema de reparo do DNA pode contribuir para a produção de alterações genéticas múltiplas e sequenciais em uma mesma célula ocorrendo adaptação clonal e progressão de células anormais, sendo fundamental para o desenvolvimento do câncer (WEINBERG, 1989; LOEB, 1991; FARBER e RUBIN, 1991; RUSSO **et al.**, 1992). O tipo de resposta a esses agentes, portanto, pode ser um marcador biológico dos indivíduos em risco para desenvolverem neoplasias.

Para avaliar esse efeito, utilizou-se no presente estudo três agentes químicos mutagênicos que atuam de diferentes formas sobre o DNA, a BLM, a MMC e a BrdU, e no segundo experimento utilizou-se o agente químico mais eficaz do primeiro experimento, que foi a BLM, e um agente fisico, o raio X. Em relação ao experimento I, a MMC atuou fracamente sobre os indivíduos da amostra CI como indutor de anomalias cromossômicas, o que pode ter ocorrido devido a necessidade de ativação metabólica (KOROLKOVAS e BURCKHAETER, 1982). Os demais agentes, BLM e BrdU, manifestaram efeito genotóxico. Na amostra PI, as frequências médias de metáfases com aberrações cromossômicas nos grupos experimentais tratados foram muito maiores do que a do grupo ST, confirmando que os agentes utilizados mostraram genotoxicidade. Diversos estudos tem demonstrado tal efeito, tanto utilizando a BLM (GUNDY **et al.**, 1990; LOPEZ-LARRAZA, 1990a e 1990b; POVIRK e AUSTIN, 1991; LOPEZ -LARRAZA e BIANCHI, 1993), a MMC (ISHII, 1981; HANSSON **et al.**, 1984; SASAKI **et al.**, 1987; CORTES **et al.**, 1992; DAZA **et al.**, 1992; FRANCESCHI **et al.**, 1992; RUSSO **et al.**, 1992), como utilizando a BrdU (RAJ e HEDDLE, 1980; KURVINK e CERVENKA, 1990; DUTRILLAUX **et al.**, 1991; FRIAS **et al.**, 1991; MORRIS, 1991; POMMIER **et al.**, 1991).

A comparação de frequências médias de células com anomalias cromossômicas dos controles com as dos pacientes mostrou diferença significativa em todos os grupos experimentais, ou seja, o efeito genotóxico foi maior nos pacientes com NF do que nos controles. Além disso, detectou-se que a intensidade de resposta dos pacientes aos agentes químicos BLM e MMC é maior do que a dos indivíduos controles, enquanto que a resposta a BrdU apesar de elevada não difere estatisticamente. Portanto, esses dados indicam que, nos pacientes com NF, a resposta aos tratamentos utilizados foi aumentada.

A análise de correlação das frequências de células com anomalias cromossômicas entre as culturas tratadas e não tratadas mostrou-se positiva e significativa entre os diferentes tratamentos nos pacientes, sugerindo que os indivíduos que apresentavam taxas mais elevadas de

unesp

aberrações cromossômicas espontâneas também respondiam mais intensamente a MMC, assim como os indivíduos que respondiam mais intensamente a um dos agentes também respondiam mais intensamente aos outros dois. O número médio de eventos por célula foi significativamente maior nos pacientes do que nos controle ($t=3,87$; $P<0,05$). Assim, nos controles, 78% das metáfases com anomalias apresentaram um evento anômalo, 19% apenas dois eventos e 3% apresentaram três eventos por célula. Nos pacientes 63% das metáfases mostraram um evento, 22% apresentaram duas anomalias, e 15% mostraram três, quatro e cinco ou mais anomalias por metáfase. Assim, os agentes químicos utilizados provocaram mais alterações por célula nos pacientes do que nos indivíduos controles, sugerindo que o sistema de reparo do DNA nos pacientes com NF pode ser deficiente ou funcionar mais lentamente.

A BLM parece ser o agente químico mais eficaz para detectar instabilidade cromossômica induzida, pois produziu frequências mais elevadas de metáfases com aberrações cromossômicas, de eventos por metáfase anômala e de metáfases com quebras cromossômicas ou cromatídicas. A grande maioria das investigações com essa finalidade tem utilizado a BLM (CLARE **et al.**, 1982; CHERRY e HSU, 1983; TAGUCHI, 1987; HSU **et al.**, 1989; LIANG **et al.**, 1989; SPITZ **et al.**, 1989; KHOUZAM **et al.**, 1990; LI e SHIRAISHI, 1990; NOTGHI **et al.**, 1990; SARANAYANAN **et al.**, 1990; SCHANTZ **et al.**, 1990; VORECHOVSKY e JURASKOVA, 1990; WOLFF **et al.**, 1991). A Tabela 46 mostra os resultados obtidos por esses pesquisadores. Pode-se observar que, em apenas um caso, os pesquisadores (VORECHOVSKY e JURASKOVA, 1990) não obtiveram resultados positivos com a utilização da BLM como indutor de danos ao DNA na doença investigada. Esses resultados, inclusive o do presente estudo, mostram que existe uma concordância na literatura sobre a eficiência desse agente na detecção de indivíduos em risco de desenvolvimento neoplásico.

O principal objetivo dos estudos nessa área, portanto, tem sido a verificação de sensibilidade cromossômica em pacientes com doenças genéticas associadas a neoplasias, e com alguns tipos de cânceres. A Tabela 46 resume informações sobre sete estudos em pacientes com câncer e sete em pacientes com doenças genéticas, incluindo o presente trabalho e um com doença autoimune associada a neoplasias. Os estudos de CLARE **et al.**,(1982), LIANG **et al.** (1989) e KHOUZAM **et al.** (1990) referem-se a famílias afetadas por vários tipos de neoplasias malignas e de indivíduos da genealogia em risco para o desenvolvimento de malignidade. Os indivíduos com câncer foram todos hipersensíveis a BLM, com frequências de quebras por células (b/c) acima de 1,00, e os indivíduos supostamente em risco, em sua grande maioria,

Tabela 46. Avaliação da sensibilidade a bleomicina em diversas condições.

Referências	Doença estudada	Amostra	Resultado
CLARE **et al.**, 1982	Carcinoma de ovário	6 ind.	+
	Carcinoma de cérvix	1 ind.	+
	Carcinoma de pulmão	1 ind.	+
	Carcinoma trato aero-digestivo superior	1 ind.	+
	Adenocarc. de ovário	1 ind.	+
	Adenocarc. adrenal	1 ind.	+
	Câncer de testículo	1 ind.	+
CHERRY e HSU, 1983	Carcinoma medular tiróide	25 ind.	+
TAGUCHI, 1987	Ataxia telangiec./ leucemia	linhagem celular	+
HSU **et al.**,1989	Câncer de cólon	83 ind.	+
	Câncer de cabeça e pescoço	77 ind.	+
	Câncer de pulmão	71 ind.	+
LIANG **et al.**, 1989	Vários cânceres	13 ind.	+
SPITZ **et al.**, 1989	Câncer trato aerodi-gestivo superior	75 ind.	+
KHOUZAM **et al.**, 1990	Vários cânceres	12 ind.	+
LI e SHIRAISHI, 1990	Síndrome de Bloom Ataxia telangiec.	linhagem celular	+
NOTGHI **et al.**, 1990	Cirrose biliar primária	11 ind.	+
SAKARANAYANAN **et al.**, 1990	Síndrome de Down	7 ind.	+
SCHANTZ **et al.**, 1990	Câncer de cabeça e pescoço	84 ind.	+
VORECHOVSKY e JURASCOVA, 1990	Esclerose tuberosa	11 ind.	-
WOLFF **et al.**, 1991	Escleroderma	10 ind.	+
Presente estudo	Neurofibromatose	21 ind.	+

+ = existe sensibilidade a BLM; - = não existe sensibilidade a BLM; ind. = indivíduos.

mostraram sensibilidade a BLM, com frequências b/c menores que as dos portadores de câncer. Tais resultados indicaram que essas famílias podiam ser consideradas predispostas à neoplasias e com risco maior do que o da população geral para desenvolverem câncer.

CHERRY e HSU (1983) também estudaram indivíduos com câncer, 25 pacientes com síndrome do carcinoma medular de tiróide (MEA-II) e seus familiares (15 parentes de primeiro grau) e 20 indivíduos saudáveis (grupo controle), em culturas tratadas com BLM e sem tratamento químico. Observaram frequências de células com quebras significativamente maiores em ambas, culturas tratadas e não tratadas, dos pacientes e parentes com MEA-II, quando comparadas com as dos indíviduos controle. A MEA-II é uma condição autossômica dominante e nem sempre mostra penetrância completa e expressividade homogênea. O nível alto de calcitonina tem sido usado no diagnóstico de casos suspeitos de MEA-II, no entanto, tal fator não é observado em todos os casos e CHERRY e HSU (1983) sugeriram que a sensibilidade à BLM possa ser um marcador útil para detecção de indíviduos em risco para o desenvolvimento de MEA-II, especialmente nos membros assintomáticos da família de portadores. HSU **et al.** (1989) também estudaram casos de pacientes com câncer e sensibilidade a BLM. Verificaram que cerca de 40% a 50% dos pacientes com câncer de colon, do trato digestivo superior e do pulmão se enquadravam na classe denominada de "sensíveis" (com frequências de quebras por célula igual ou superior a 0,8), enquanto que cerca de 11% dos controles o faziam. Esses autores concluíram que a sensibilidade a mutagênicos deve desempenhar um papel importante na carcinogênese de órgãos e tecidos que tem contato direto com o ambiente externo, e propuseram que tal característica poderia ser usada de forma efetiva para identificação de pessoas em situação de risco a neoplasias malignas. SCHANTZ **et al.** (1990), em estudo prospectivo, verificaram que pacientes com tumores de cabeça e pescoço, que eram sensíveis à BLM, desenvolviam precocemente outros tumores primários com maior frequência do que os pacientes menos sensíveis, independentemente de outras variáveis como idade, sexo, exposição a álcool, fumo ou tratamentos de câncer.

TAGUCHI (1987) e LI e SHIRAISHI (1990) estudaram sensibilidade a BLM em linhagens celulares de pacientes com ataxia telangiectasia (AT) e síndrome de Bloom e também de pacientes portadores de AT com leucemia, e todas mostraram hipersensibilidade a BLM, ou seja, frequências elevadas de quebras por célula quando comparadas com as dos controles. Na cirrose biliar primária, cuja etiologia ainda não é bem conhecida, observa-se a

destruição progressiva dos ductos biliares intra-hepáticos, e os pacientes portadores dessa condição apresentam alterações do sistema imune (MANNS **et al.**, 1987). NOTGHI **et al.** (1990) estudaram linfócitos de sangue periférico de pacientes com essa patologia tratados com BLM e encontraram frequências de metáfases com aberrações cromossômicas dez vezes maior do que as observadas nos controles. De acordo com MILLS **et al.** (1982) e GOUDIE **et al.** (1985), NOTGHI **et al.** (1990) sugerem que a instabilidade cromossômica observada nesses pacientes possa ser uma das explicações para a incidência aumentada de neoplasias, principalmente o carcinoma de mama.

Escleroderma e cirrose biliar primária são patologias associadas e RITTNER **et al.** (1988) mostraram que a escleroderma parece tratar-se de uma entidade hereditária dominante com frequências elevadas de quebras cromossômicas. WOLFF **et al.** (1991) estudaram linfócitos de sangue periférico de dez pacientes com escleroderma e de vinte e um controles, e encontraram frequências significativamente elevadas de metáfases com aberrações cromossômicas induzidas por BLM quando comparadas com as dos indivíduos controle, mas não encontraram instabilidade cromossômica espontânea.

A base genética da sensibilidade à BLM ainda não é bem conhecida (POVIRK e AUSTIN, 1991). No entanto, há sugestões de que a base genética esteja associada a genes responsáveis pelo reparo do DNA, com base em alguns achados. Por exemplo, deficiências de vários genes envolvidos no reparo do DNA tem contribuído para hipersensibilidade a mutagênicos em determinados indivíduos, como é o caso dos pacientes com xeroderma pigmentoso, que são deficientes em enzimas envolvidas no reparo por excisão (SETOLW **et al.**, 1969). Semelhantemente, os pacientes com síndrome de Bloom são deficientes de outra enzima de reparo do DNA, a ligase I (WILLIS e LINDAHL, 1987; CHAN **et al.**, 1987), resultando na hipersensibilidade a mutagênicos, como a MMC. Embora ainda não tenha sido identificada a deficiência enzimática específica em pacientes com AT (POVIRK e AUSTIN, 1991), estes são incapazes de reparar danos no DNA induzidos por radiação ionizantes e BLM (CORNFORTH e BEDFORD, 1985; HITTELMAN e SEN, 1988). Além disso, a análise utilizada tem o objetivo de testar a capacidade das células de repararem lesões cromossômicas induzidas pela BLM. Como a BLM foi adicionada na cultura de linfócitos cinco horas antes da colheita, as células que foram analisadas estavam, no mínino, no período S do ciclo celular. Portanto, as alterações cromossômicas induzidas no início do tratamento deveriam ser reparadas durante a fase G2. Assim sendo, indivíduos com capacidade de reparo eficiente deveriam apresentar baixas

frequências de alterações cromossômicas e indivíduos com deficiência de reparo do DNA deveriam apresentar altas frequências de aberrações cromossômicas. Dessa forma, os resultados obtidos em vários estudos que usaram tal metodologia, incluídos os do presente estudo, sugerem que os genes que controlam o reparo de lesões no DNA sejam alterados nos indivíduos sensíveis a BLM.

A BLM produz quebras no DNA de células de mamíferos e as enzimas envolvidas no seu reparo ainda não foram identificadas (POVIRK e AUSTIN, 1991; CHERRY **et al.**, 1992). Há evidências de que a DNA polimerase alfa possa ser uma delas, pois experimentos com afidicolina, um inibidor dessa enzima, e BLM mostram frequências altas de danos no DNA quando comparadas com as frequências obtidas na ausência da BLM e presença da afidicolina (HSU **et al.**, 1986b). CHERRY **et al.** (1992 para referências) referiram que a endonuclease IV está envolvida na remoção da área do DNA lesado pela BLM, e em seguida ocorre a atividade das polimerases e ligases. No entanto, parece que existem muitas outras enzimas de reparo envolvidas, como evidenciado pelos estudos de SEN e HILTTELMAN (1984) e SIDIK e SMERDON (1990), os quais indicaram que o reparo por excisão de lesões induzidas pela BLM em linfócitos humanos é um processo complexo, consistindo de uma taxa de reparo rápido (cerca de 30 minutos) seguida por uma lenta (várias horas).

Em relação aos pacientes com neurofibromatose, encontrou-se na literatura apenas alguns estudos referindo o efeito de agentes indutores de alterações cromossômicas. HAFEZ **et al.** (1985 e 1986) encontraram frequências mais elevadas de anomalias cromossômicas em linfócitos expostos a radiações de pacientes com NF1 do que de indivíduos normais, enquanto que GRANDBERG-OHMAN **et al.** (1988) não observaram diferenças entre pacientes e controles em relação a taxa de clastogenicidade e as frequências de trocas entre cromátides-irmãs induzidas pela MMC.

HANNAN **et al.** (1990) estudaram a radiossensibilidade em fibroblastos derivados de MCCL de uma paciente com NF6 (NF MCCL familial). Não foi observada radiossensibilidade quando se comparou linhagens celulares da paciente com a dos controles após irradiação gama aguda. No entanto, observaram elevada radiossensibilidade dos fibroblastos obtidos da pele normal da paciente após irradiação gama crônica e as células derivadas das MCCL mostraram sensibilidade intermediária após irradiação gama crônica, quando comparadas com as células controle e com os fibroblastos derivados da pele normal da paciente. Os autores enfatizaram a utilidade da irradiação crônica na detecção de radiossensibilidade celular, a qual pode ser

resultado de um defeito no mecanismo de reparo dos pacientes com NF e sugerem que a radiossensibilidade elevada das células pode ser responsável por um aumento de alterações genéticas e transformação celular levando a produção de MCCL e tumores nos pacientes com NF.

Investigando a existência de sensibilidade mutagênica em pacientes com lesões cancerosas e pré-cancerosas de cérvix uterino, MURTY **et al.** (1987) utilizaram a MMC. Os resultados indicaram que a instabilidade cromossômica nessas lesões não estavam associadas com a sensibilidade a MMC. Os mesmos resultados foram obtidos por ADHJARYU **et al.** (1985), em pacientes com carcinoma cervical, e por HEIM (1985), em culturas de linfócitos de pacientes com adenomatoses de cólon e reto, tais pesquisadores também não observaram instabilidade cromossômica espontânea. SHIRAISHI **et al.** (1979) observaram um aumento significativo nas frequências de trocas entre cromátides -irmãs(TCIs) induzidas por MMC em pacientes com leucemia e em linhagens celulares de linfoma, quando comparadas com linfócitos normais. Por outro lado, LI **et al.** (1982) não encontraram aumento nas frequências de TCIs induzidas por MMC em linhagens celulares de melanoma e tumor de cólon. WIENEKE **et al.** (1982) também relataram um nível baixo de frequência de TCIs induzidas por MMC em linfócitos de pacientes com tumores sólidos. Dessa forma, apesar de alguns pesquisadores não terem obtido resultados positivos, há indicação de que os indivíduos com alguns tipos de cânceres são sensíveis ao efeito da MMC. Os resultados desta investigação mostraram que a MMC, em culturas de pacientes com NF, induziu frequências aumentadas de anomalias cromossômicas, efeito este semelhante ao produzido pela BLM. Assim, os agentes que atuam no DNA pelos mecanismos de ação de degradação e alquilação, parecem ser eficientes para detectar os indivíduos com instabilidade cromossômica elevada devido a possíveis defeitos no mecanismo de reparo do DNA, em pacientes com NF. Como já referido, a BrdU, um agente intercalante, não mostrou a mesma eficiência, provavelmente em função de alterações específicas no mecanismo de reparo desses pacientes, as quais não fazem parte do reparo necessário quando o DNA é alterado pela BrdU.

POMMIER **et al.** (1991) pesquisaram linhagens celulares de pacientes com síndrome de Bloom, uma condição associada ao desenvolvimento de câncer com fotossensibilidade cutânea e instabilidade cromossômica espontânea, e encontraram frequências significativamente elevadas de TCI após tratamento com BrdU. Alguns pequisadores, como HEARTLEIN **et al.** (1987), propuseram que esses pacientes apresentassem deficiência da topoisomerase II (enzima

envolvida no reparo do DNA). No entanto, POMMIER **et al.** (1991) obtiveram frequências semelhantes de lesões no DNA quando utilizaram inibidores da topoisomerase II, sugerindo que as lesões provocadas pela BrdU são independentes da atividade da topoisomerase II. Pesquisas anteriores haviam sugerido que as células dos pacientes com a síndrome de Bloom apresentavam deficiência da DNA ligase I (WILLIS **et al.**, 1987; CHAN **et al.**, 1987; RUNGER e KRAEMER , 1989). Todavia, ainda não são conhecidas as enzimas envolvidas no sistema de reparo de lesões do DNA induzidas por mutagênicos nesses pacientes.

Em todos os grupos experimentais analisados, das amostras CI e PI, no presente estudo, as quebras e as falhas foram as anomalias estruturais observadas. Na literatura pesquisada, a grande maioria dos experimentos que utilizam agentes químicos, principalmente BLM e MMC também encontraram geralmente alterações cromossômicas do tipo quebras e falhas. Em frequências muito baixas, apareceram outras alterações como cromossomos dicêntricos, fragmentos cromossômicos, cromossomos em anel e translocações. CLARE **et al.** (1982) e DENG **et al.** (1992) encontraram frequências de quebras maiores do que as de falhas. NOTGHI **et al.** (1990) e HOU **et al.** (1992) detectaram frequências de falhas maiores do que as de quebras, e VORECHOUSKI e JURASCOVA (1990) não encontraram diferenças entre as frequências de quebras e falhas. No entanto, na grande maioria dos experimentos dessa natureza foram pesquisadas apenas a presença de quebras (CHERRY e HSU, 1983; MURTY, 1987; TAGUCHI, 1987; HSU **et al.**, 1989; SPITZ **et al.**, 1989; LI e SHIRAISHI, 1990; SARANAYANAN **et al.**, 1990; FRIAS **et al.**, 1991; CORTES **et al.**, 1992; FRANCHESCHI **et al.**, 1992; MATSUMARA **et al.**, 1993).

No experimento I do presente trabalho foram obtidas frequências maiores de quebras do que de falhas, numa proporção aproximada de 60% de quebras para 40% de falhas.

Essa variação pode ser decorrente do tipo de agente químico adicionado à cultura celular. A BLM, por exemplo, um agente degradante de DNA, produz muito mais quebras do que falhas. No entanto, os próprios critérios de classificação dessas anomalias cromossômicas devem contribuir para tal variação, pois a ocorrência de dobramentos ou outros detalhes técnicos, como superposições cromossômicas, resíduos de citoplasma e grau acentuado de condensação cromossômica, podem dificultar a classificação correta do evento observado, tornando o julgamento subjetivo.

Os eventos cromatídicos devem se originar após a fase de duplicação do DNA, quando as cromátides-irmãs já estão individualizadas. Já os eventos cromossômicos devem ser

unesp

produzidos por alterações pré-duplicativas que não foram reparadas, embora não se possa excluir a possibilidade de um agente afetar, igualmente, ambas as cromátides em certo loco, após a duplicacão. No presente estudo, as quebras e falhas do tipo cromatídico foram mais frequentes na maioria dos grupos experimentais de CI e no grupo ST de PI, com frequências percentuais aproximadas de 60% de alterações cromatídicas e 40% de alterações cromossômicas, nos demais grupos da amostra PI, a proporção de alterações cromatídicas e cromossômicas observadas foi de aproximadamente 1:1.

De acordo com as considerações apresentadas na Introdução, parece interessante utilizar agentes mutagênicos com diferentes mecanismos de ação sobre o DNA para avaliar instabilidade cromossômica, pois não se sabe qual a alteração que as células dos pacientes, objeto de investigação, apresentam em seu DNA (HSU **et al.**, 1989; CHERRY **et al.**, 1992).

AU **et al.** (1991) propuseram a avaliação da sensibilidade a mutagênicos com um agente fisico, desenvolvendo uma metodologia específica a qual denominaram "challenge assay",conforme também discutido na Introdução deste trabalho, e a radiação ionizante tem sido o agente mais indicado nesse caso.

É interessante avaliar a resposta dos pacientes com NF aos raios X (RX), pois os dados da literatura mostram que os mecanismos enzimáticos para o reparo de danos causados pela BLM e RX parecem ser semelhantes (UTSUMI e ELKIND, 1989; KOBERLE e SPEIT, 1991). Os resultados do experimento II do presente estudo mostraram que, assim como a BLM, o RX produziu frequências elevadas de metáfases com aberrações cromossômicas, tanto comparando com as da amostra controle como com as frequências de metáfases anômalas de ST e BLM dos pacientes com NF. Os achados do experimento II corroboraram os achados do experimento I, os quais mostraram que os pacientes com NF apresentavam sensibilidade a agentes indutores de mutagenicidade.

A avaliação com um agente fisico, como o RX, é bastante adequada, pois o efeito deste não é alterado pelo metabolismo celular, diferentemente dos agentes químicos.

O número médio de eventos anômalos por célula diferiu entre as amostras CII e PII, e também constatou-se diferenças nos grupos experimentais dentro das amostras, ou seja, BLM e RX produziram um número maior de aberrações cromossômicas por metáfases e, nas culturas tratadas com RX esse número foi ainda mais elevado. As alterações cromossômicas estruturais mais comuns observadas foram do tipo quebras e falhas cromossômicas,dicêntricos, acêntricos e anéis. Outros tipos, como deficiência e duplicação de segmentos cromossômicos e marcadores

foram observados em frequências muito baixas. As culturas sem tratamento e as tratadas com BLM, em ambas as amostras, apresentaram quase que exclusivamente alterações dos tipos quebras e falhas, sendo as primeiras observadas em maior frequência em todos os casos, principalmente nos pacientes expostos a BLM, os quais mostraram 79,6% de quebras e 29,4% de falhas. Nas culturas tratadas com RX, os tipos de eventos mais frequentes em ambas as amostras foram fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e quebras. No entanto, tais eventos foram sempre mais comuns na amostra PII: 37,5% foram do tipo fragmentos acêntricos, 26,7% foram do tipo quebras e 23,3% do tipo cromossomos dicêntricos.

Esses resultados mostram que as alterações cromossômicas foram sempre mais frequentes nos pacientes com NF do que nos controles submetidos ao mesmo tratamento. Em relação a BLM, os achados do experimento II comprovam os do experimento I, e também mostram que o RX apresentou atividade clastogênica, assim como os agentes químicos no experimento I. O RX induz aberrações cromossômicas em todas as fases do ciclo celular (PRESTON **et al.**, 1981) e a análise dessas células foi realizada no primeiro ciclo de divisão celular após o tratamento, de acordo com o protocolo do "challenge assay", portanto as células passaram por uma única oportunidade de reparo.

A radiossensibilidade tem sido verificada em várias doenças genéticas associadas a neoplasias. Sabe-se que os indivíduos com síndrome de Down apresentam incidência aumentada de leucemia (MILLER, 1970). Várias pesquisas em pacientes com síndrome de Down mostraram que esses apresentam sensibilidade cromossômica em culturas de linfócitos de sangue periférico expostas a RX, e algumas dessas pesquisas utilizaram metodologia semelhante ao do "challenge assay" (VIJAYALAXMI e EVANS, 1982; LEONARD e MERZ, 1983; MORIMOTO **et al.**, 1984; SHAFIK **et al.**, 1987, 1988 e 1990). No entanto, ainda não se conhece o mecanismo envolvido na radiossensibilidade desses pacientes (MacLAREN **et al.**, 1989; SHAFIK **et al.**, 1990). Inúmeras outras condições apresentam respostas semelhantes. A síndrome de Gardner é uma condição autossômica dominante caracterizada por múltiplos pólipos, que se malignizam com alta frequência. Culturas de fibroblastos de pacientes com síndrome de Gardner mostraram hipersensibilidade a RX, irradiação ultra-violeta e MMC (LITTLE **et al.**, 1980; KINSELLA **et al.**, 1982). Pacientes com AT (BIGELOW **et al.**, 1979; PARSHAD **et al.**, 1985b), síndrome de Bloom, polipose familial e xeroderma pigmentoso também mostraram incidência aumentada de quebras cromatídicas em culturas de fibroblastos expostas a RX durante a fase G2 do ciclo celular (PARSHAD **et al.**, 1983, 1985a e 1985b). Há sugestões de que as células desses pacientes sejam deficientes em algum passo do sistema de reparo do DNA, possivelmente alguma enzima envolvida no reparo por excisão. Tais suposições

unesp

foram obtidas de resultados citogenéticos e de uso de inibidores de reparo, como a ara-C (PARSHAD, 1985).

Instabilidade cromossômica semelhante a observada em pacientes com AT, e hipersensibilidade a RX, tem sido encontrada em pacientes cujo fenótipo clínico não é compatível com AT, por isso eles foram considerados como portadores de síndromes relacionadas a AT (WEGNER **et al.**, 1988; CURRY **et al.**, 1989; TAALMAN **et al.**, 1989).

A disqueratose congênita é uma doença hereditária, com formas recessivas ligadas ao X ou autossômica, caracterizada por pigmentação reticular da pele e predisposição a câncer de pele no início da idade adulta. SCHNEIDER **et al.** (1988) encontraram instabilidade cromossômica espontânea em linfócitos e fibroblastos desses pacientes, e DeBAUCHE **et al.** (1990) detectaram frequências elevadas de quebras cromatídicas em fibroblastos expostos a RX na fase G2, quando comparadas com as observadas nas culturas controles. Os autores ressaltaram que ainda não se conhece o significado desse achado em pacientes com disqueratose congênita, mas a susceptibilidade aumentada de quebras cromatídicas induzidas por RX pode servir como um marcador celular de valor diagnóstico.

Assim, várias pesquisas tem mostrado que os testes de sensibilidade mutagênica são importantes para detecção de indivíduos em risco para desenvolverem câncer e sugerem possíveis deficiências no mecanismo de reparo do DNA.

Como já referido, alguns pesquisadores tem investigado a sensibilidade a mutagênicos, sendo a bleomicina um dos agentes mais utilizados. Alguns destes trabalhos tem estabelecido um limear de hipersensibilidade à BLM. HSU (1987) estimou o valor médio de b/c em indivíduos normais em 0,02 (variando de 0 a 0,08), e verificou que a média de b/c varia de 0,2 a 2 ou mais, em linfócitos de indivíduos normais tratados com BLM. HSU **et al.** (1989) consideraram sensíveis a BLM, indivíduos com média de b/c acima de 0,80. Em relação ao parâmetro frequência de indivíduos sensíveis, há sugestões de que os portadores de neurofibromatose sejam em maior frequência mais sensíveis do que os indivíduos controle, pois entre 21 pacientes investigados, quatro (19%) foram classificados como sensíveis, e entre os 16 controles analisados nenhum era sensível.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que os pacientes portadores de neurofibromatose apresentam instabilidade cromossômica espontânea e mostram sensibilidade aumentada aos agentes químicos testados, principalmente a BLM e a MMC, e ao agente fisico RX, sensibilidade a qual pode estar ligada a deficiência no sistema de síntese de reparo do DNA.

unesp

V. RESUMO

A NF é uma das doenças autossômicas dominantes mais frequentes na espécie humana. A expressividade clínica extremamente variável muitas vezes dificulta seu diagnóstico,classificação em tipos e, consequentemente, o aconselhamento genético. Além disso, a condição é frequentemente associada com o desenvolvimento de tumores diversos, além dos neurofibromas. Com a finalidade de contribuir para o esclarecimento de alguns desses problemas, realizou-se uma investigação genético-clínica em 67 indivíduos portadores de NF, pertencentes a 43 famílias. Observou-se recorrência da condição em 46 indivíduos de 22 famílias (51,2%) e a NF ocorreu como caso único em sua família em 21 pacientes (48,8%). Os heredogramas de todas as famílias que mostraram recorrência da NF foram compatíveis com padrão de herança autossômico dominante. Sessenta pacientes de 38 famílias (89,6%) foram classificados no tipo NF1, um paciente (1,5%) foi enquadrado no tipo NF3 (misto), dois pacientes de duas famílias (3%) foram classificados no tipo NF5 (segmentar), três pacientes (4,4%) de uma família foram classificados no tipo NF6 (MCCL familial) e um paciente (1,5%) foi enquadrado no tipo NF7. Os principais sinais clínicos detectados foram manchas café-com-leite (MCCL), neurofibromas, sardas axilares e nódulos de Lisch. Contudo, diferentes tipos de alterações psicológicas, de alterações oculares e de alterações ósseas foram também encontradas com frequências bastante elevadas. Baixa estatura, macrocefalia e retardo mental foram observadas na maioria dos pacientes e outros sinais como alterações eletrocardiográficas e eletroencefalográficas foram menos constantes. Para investigar possíveis causas para a associação com neoplasias, foram conduzidos experimentos para investigar as frequências de aberrações cromossômicas estruturais em cromossomos metafásicos de linfócitos de sangue venoso periférico de pacientes com NF, com manifestação espontânea ou após a exposição a agentes genotóxicos com diferentes mecanismos de ação sobre o DNA, como o degradante bleomicina (BLM), o alquilante mitomicina-C (MMC), o intercalante bromodesoxiuridina (BrdU) e os raios X (RX). No primeiro experimento, as células de 10 pacientes com NF (PI) e sete controles (CI) foram expostas aos agentes químicos BLM, MMC e BrdU; no segundo, as células de 11 pacientes (PII) e nove controles (CII) foram expostas a BLM e RX. Nas culturas sem tratamento, as frequências de metáfases com anomalias foram sempre maiores no grupo dos paciente (PI e PII) do que no dos controles (CI e CII), sugerindo que os pacientes com NF expressavam instabilidade cromossômica. Os agentes mutagênicos testados foram eficazes

indutores de mutagenicidade, pois as culturas tratadas expressavam frequência maior de metáfases com aberações cromossômicas que os controles da mesma amostra, em ambos os experimentos. Nas culturas tratadas com BLM e RX, observou-se frequências mais altas de células com anomalias nos pacientes do que nos controles, mostrando que os pacientes com NF intensificaram as respostas aos agentes mutagênicos testados, o que pode estar ligado a deficiência no sistema de síntese de reparo do DNA.

VI. SUMMARY

Neurofibromatosis (NF) is one of the most common autosomal dominant diseases in humans. However, the extensive variation in its clinical expressiveness sometimes makes diagnosis, type identification and, as a consequence, genetic counseling very difficult. Moreover, the condition is often related with the development of several tumors, in addition to the neurofibromas. To contribute to a better understanding of these problems, a genetic-clinical investigation was carried out in 67 individuals diagnosed as NF patients, from 43 families. Recurrence of the condition was observed in 46 individuals (68.7%) of 22 families and NF occurred as a unique case in 21 families (31.3%). All families with recurrence showed an heredity pattern compatible with the autosomal dominant model. Sixty patients in 38 families (89.6%) were classified as NF1, one patient (1.5%) as NF3 (mixed), two patients in two families (3%) as NF5 (segmental), three patients (4.4%) in one family as NF6 (familial MCCL) and one patient (1.5%) as NF7. The main clinical signs detected were cafe-au-lait spots (MCCL), neurofibromas, axillary freckling, and Lisch nodules. However, different types of psychological, ocular and bone alterations were also found in high frequencies among the patients. Also, short stature, macrocephaly and mental retardation were observed in the majority of the patients. Other signs, such as electrocardiographic and electroencephalographic abnormalities were less common. In order to detect possible causes for the association with neoplasias, the frequencies of spontaneous and induced structural chromosome mutations in metaphase chromosomes of lymphocytes of peripheral blood of NF patients were performed. Genotoxic agents with different mechanisms of action on DNA, such as the degrading agents X-rays and bleomycin (BLM), the alkylating agent mitomycin C (MMC), and the intercalating agent bromodeoxyuridine (BrdU), were used as breakage inducers. In the first experiment, cells from 10 patients with NF (PI) and seven controls (CI) were exposed to BLM, MMC and BrdU; in the second experiment, cells from 11 patients (PII) and nine controls (CII) were exposed to BLM and RX. In cultures with no management, the frequencies of metaphases with abnormalities were always higher in the patient groups (PI and PII) than in the reference groups (CI and CII), suggesting that the NF patients exhibited chromosomal instability. Tested mutagenic agents were effective mutagenicity inducers and the exposed cultures showed higher frequency of abnormal metaphases than the non-exposed ones. In the cultures exposed to BLM and RX, higher frequencies of cells with abnormalities in the patients than in the reference group were observed, showing that the NF patients enhanced the responses to the genotoxic agents. These findings may be associated to some sort of deficiency in the DNA repair mechanisms in NF patients, which requires further and more specific analysis.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADHVARYU, S. G., VYAS, R. C., DAVE, B. J., TRIVEDI, A. H., PARIKH, B. N. Spontaneous and induced sister chromatid exanges frequencies and cell cycle progression in lymphocytes of patients with carcinoma of the uterine cervix. **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 14, p. 67-71, 1985.

AKBARNIA, B. A., GABRIEL, K. R., BECKMAN, E., CHALK, D. Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis. **Spine**, v. 17, p. 244-248, 1992.

ALOI, F., MASSOBRIO, R. Solitary plexiform neurofibroma. **Dermatologica**, v. 179, p. 84-86, 1989.

ALLANSON, J. E., HALL, J. G., Van ALLEN, M. I. Noonan phenotype associated with neurofibromatosis. **Am. J. Med. Genet.**, v. 21, p. 457-462, 1985

AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, v.17, p.389-393, 1984.

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

ANDERSEN, L. B., FOUNTAIN, J. W., GUTMANN, D. H., TARLÉ, S. A., GLOVER, T. W., DRACOPOLI, N. C., HOUSMAN, D. E., COLLINS, F. S. Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. **Nature Genet**., v. 3, p.118-121, 1993.

ANTLE, C. M., DAMJI, K. F., WHITE, V. A., ROOTMAN, J. Uveal malignant melanoma and optic nerve glioma in Von Recklinghausen´s neurofibromatosis. **British J. Ophthalm**., v. 74, n. 2, p. 501-504, 1990.

ARLETT, C.F., LEHMANN. A.R. Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. **Annu. Rev. Genet.**, v. 12, p. 95-115, 1978.

ATHANASIOU, A., SIDERIS, E. G., BARTSOCAS, C. Decreased repair of X-ray induced DNA single-strand breaks in lymphocytes in Down´s syndrome. **Pediatr. Res.**, v. 14, p. 336-338, 1980.

AU, W.W., WALKER, D. M., WARD. JR, J.B., NHORTON, E. LEGATOR, M.S., SINGH, V. Factors contribritig to chromodome damage in lymphryts of cigarret ambers. **Mutat. Res.**, v. 260, p. 137-144., 1991.

BADER, J. L. Neurofibromatosis and cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci**., v. 486, p. 57-65, 1986.

BALESTER, R., MARCHUK, D., BOGUSKI, M., SAULINO, A., LETCHER, R. **et al.** The NF1 locusencodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. **Cells**, v. 63, p. 851-859, 1990.

unesp

BARKER, D. E., WRIGHT, K., NGUIEN, K., CANNON, L., FAIN, P., GOLDGAR, D., BISHOP. D. T., CAREY, J., BATY, B., KIVLIN, J., WILLARD, H., WAYE, J. S., GREIG, G., LEINWARD, L., NAKAMURA, Y., O'CONNEL, P., LEPPERT, M., LALOUEL, J. M., WHITE, R., SKOLNICK, M. Gene for Von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentric region of chromosome 17. **Science**, v. 236, p. 1100-1102, 1987.

BEITER, M., INGERSOLL, G., GANSER, J. ORR, D. P. Relationship of somatic symptoms to behavioral and emotional risk in young adolescents. **J. Pediatr.**, v. 118, p. 473-478, 1991

BENINSON, D., LLOYD, C.D., NATARAJAN, G. et al. Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. **International Atomic Energy Agency.** Viena. 1986

BHATTACHARYYA, R., JAMIESON, G. G. Recurrent perforation complicating intestinal neurofibromatosis. **Aust. N. Z. J. Surg**., v. 58, p. 749-751, 1988.

BIELFELD, V., WEICHENTHAL, M., ROSER, M., BREITBART, E., BERGER, J., SEEMANOVA, E., RUDIGER, H. W. Ultraviolet-induced chromosomal instability in cultured fibroblasts of heterozygote carriers for xeroderma pigmentosum. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, p. 219-226, 1989.

BIGELOW, S. B., RARY, J. M. BENDER, M. A. G2 Chromosomal radiosensitivity in Fanconi´s anemia. **Mutat. Res.**, v. 63, p. 189-199, 1979.

BIJLMA, E. K., BROUWER-MLADIN, R., BOSCH, D. A., WESTERVELD, A., HULSEBOS, T. J. Molecular characterization of chromosome 22 deletions in schwannomas. **Genes, Chromosom. Cancer**, v. 5, p. 201-205, 1992.

BISHOP, J. M. The molecular thermes in oncogenesis. **Cell**, v. 305, p. 235-248, 1991.

BLICKSTEIN, I., LURIE, S. The gynaecological problems of neurofibromatosis. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 30, p. 380-382, 1990.

BOLTSHAUSER, E., KILCHHOFER, A., FUELLE, V. Neurofibromatosis iris hamartoma as diagnostic criterion. **Helv. Pediatr. Acta**, v.40, p. 202-205, 1985.

BOLTSHAUER, E., STOCKER, H., MACHLER, M. Neurofibromatosis type 1 in a child of a parent with segmental neurofibromatosis (NF-5). **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 244-255, 1989.

BORIT, A., RICHARDSON, E. P. The biological and clinical behavior of pilocytic astrocytomas of the optic pathways. **Brain**, v. 105, p. 161-187, 1982.

BOUSEMA, M.T., VUZEVSKI, V.D., ORANJE, A.P., HEYLE, F., STOLZ, E., van JOOST, T. Non-von Recklinghausen's neurofibromatosis resembling a giant pigmented nevus. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 20, p. 358-362, 1989.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building. John Wiley & Sons, New York, 1978, 653 p.

BRASFIELD, R. D., DAS GUPTA, T. K. Von Recklinghausen´s diseases: A clinicopathological stydy. **Ann. Surg.**, v. 175, p. 86, 1972.

BROWNSTEIN, S., LITTLE, J. M. Ocular neurofibromatosis. **Ophthalmology**, v. 90, p. 1595-1599, 1983.

BUCHBERG, A.M., CLEVELAND, L.S., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway, **Nature**, v. 347, n. 20, p. 291-294, 1990.

BURGER, R. M., FREEDMAN, J. H., HORWITZ, S. B., PEISACH, J. DNA degradation of manganese (II)- bleomycin plus peroxide. **Inorg. Chem.**, v. 23, p. 2215-8614, 1984.

BURKE, J. P., LEITCH, J., TALBOT, J. F., PARSONS, M. A. Chroidal neurofibromatosis with congenital íris ectropion and buphthalmos: relationship and significance. **J. Pediatric. Ophthalm. & Strabisms**, v. 28, n. 5, p. 265-267, 1991.

BURWELL, R. G., JAMES, N. J., JOHNSTON, D. I. Café-au-lait spots in school children. **Arch. Dis. Child**., v. 57, p. 631-632, 1982.

CALDECOTT, K., JEGGO, P. Cross-sensitivity of X-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. **Mutat. Res.**, v. 255. p. 111-121, 1991.

CALVERT, P. EDGAR, M., WEBB, P. Scoliosis. The natural history, The natural history with and without operation. **J. Bone Joint. Surg**., v. 71, p. 246-251, 1989.

CALZAVARA, P. G., CARLINO, A., ANZOLA, G. P. Segmental neurofibromatosis. **Neurofibromatosis**, v.1, p. 318-322, 1988.

CAREY, J. C., LAUB, J. M., HALL, B. D. Penetrance and variability in neurofibromatosis: a genetic study of 60 families. **Birth Defects**, v. 15, n. 5B, p. 271-281, 1979.

CAREY, J. C., BATY, B. J., JOHNSON, J. P., MORRISON, T., SKOLNIK, M., KIVLIN, J. The genetic aspects of neurofibromatosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 486, p. 45-56, 1986.

CARTER, S. K., BAKOVSKI, M. T., HELLMANN, K. **Chemoterapy of Cancer.** New York. John Wiley e Sons, 1981, 379p.

CAWTHON, R. M., WEISS, R., XV, G. **et. al.** A major neurofibromatosis type-1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. **Cell**, v. 62, p. 193-201, 1990.

CAWTHON, R. et al. 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.

CAWTHON **et al.** c DNA sequence and genomic structure of EV12B a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. **Genomics**, v. 9, p. 446-460, 1991.

CHAN, J. Y., BECKER, F. F., GERMAN, J., RAY, J. H. Altered DNA ligase I activity in bloom´s syndrome cells. **Nature**, v. 325, p. 357-359, 1987.

CHANG, C. H., MEARES, C. F. Cobalt-bleomycins and deoxyribonucleic acid: sequence dependent interactions, action spectrum for nicking, and indifference to oxygen. **Biochemistry**, v. 23, p. 2268-2274, 1984.

CHEE, C. P. Lateral thoracic meningocele associated with neurofibromatosis: total excision by posterolateral extradural approach. **Spine**, v. 14, n. 1, p. 129-131, 1989.

CHERRY, L.M., HSU, T.C. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members. **Anticancer Res.**, v. 3, p. 367-372, 1983.

CHERRY, L. M., FUNK, J., LESSER, J. M., LESAM, M. Gender differences and the interpretation of genetic instability in Alzheimer´s disease. **Mutat. Res.**, v. 275, p. 57-67, 1992.

CLARE, M. G., JONES, W. G., TAYLOR, J. H. Sister Chromatid Exchanges in human lymphocytes exposed to single cytotoxic drugs **in vivo** or **in vitro**. **Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.,** v. 18, n. 10, p. 979-989, 1982.

COLLINS, F. S., PONDER, B.A.J., SEIZINGER,B.R., EPSTEIN, C.J. Editorial: The von Recklinghausen neurofibromatosis region on chromosome 17-genetic and physical maps come into focus. **Am. J. Hum. Genet.,** p. 1-5, 1989a.

COLLINS, F. S., O´CONNELL, P., PONDER, B. A. J., SEIZINGER, B. R. Progress towards identifying the neurofibromatosis (NF1) gene. **Hum. Genet. Dis.**, v. 5, n. 7, p. 217-221, 1989b.

CORNFORTH, M. N., BEDFORD, J. S. On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia telangiectasia. **Sciense**, v. 227, p. 1589-1591, 1985.

CORTES, F., MATEOS, S., ORTIZ, T., PANNEERSELVAM, N., MATEOS, J. C. Poly-D-lysine in G2 potentiates chromosome damage induced by X-rays and mitomycin in CHO cells. **Mutat. Res.**, v. 266, p. 99-103, 1992.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística.** Editora Edgard Blucher Ltda., 1ª.ed., 1977, 264 p.

COUNTURIER, J. DELA-TTRE, O., KUJAS, M., PHILIPPON, J., PETER, M., ROULEAU, G., AURIAS, A., THOMAS, G. Assessment of chromosome 22 anomalies in neurinomas by combined karyotype and RFLP analyses. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 45, p. 55-62, 1990.

CRAWFORD, A. H., BAGAMERY, N. Osseous manifestations of neurofibromatosis in childhood. **J. Ped. Orthop.**, v. 6, p. 72-88, 1986.

CROOKE, S. Biochemical effects of drugs on cell nucleous. **In**: Busch, J., Crook, S, Daskal, Y. eds. **Effects of druggs on de cell nucleus**. NY. Academic Press, p. 127-143, 1979.

CROWE, F. W. Axillary freckling as a diagnostic aid in neurofibromatosis. **Ann. Intern. Med.**, v. 61, p. 1142-1143, 1964.

CRUMP T. Translation of case reports in Veber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den Multiplen Neuromen by F. v. Rechlinghausen. **Adv. Neurol.**, v. 29, p. 259-175, 1981.

CURRY, C., J. R., TSAI, J., HUTCHINSON, H. T., JASPERS, N. G. J., WARA, D., GATTI, R. AT: a phenotype linking ataxia-telangiectasia with the nymegen breakage syndrome. **Am J. Hum. Genet.**, v. 45, p. 270-275, 1989.

DAWSON, T. Regional eruptive neurofibromatosis. **Br. J. Dermatol.**, v. 111, suppl. 26, p. 65, 1984.

DAZA, P., ESCALZA, P., MATEOS, S., CORTES, F. Mytomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulfonate induced long-lived lesions in DNA wich result in SCEs during sucessive cell cycles in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 270, p. 177-183, 1992.

DeBAUCHE, D. M., PAI, G. S., STANLEY, W. S. Enhanced G2 Chromatid radiosensitivity in Dyskeratosis Congenita fibroblasts. **Am. J. Hum.** Genet., v. 46, p. 350-357, 1990.

DENG, C. Z., ABUBAKAR, S., FONS, M. P., BOLDOGH, I, HOKANSON, J., AV, W. W., ALBRECHT, T. Cytomegalovirus-enhanced induction of chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes treated with potent genotoxic agents. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, v. 19, p. 304-310, 1992.

DESTRO, M., D´AMICO, D. J., GRAGOUDAS, E. S., BROCKHURSRST, R. J., PINNOLIS, M. K., ALBERT, D. M., TOPPING, T. M., PULIAFITO, C. A. Retinal manifestations of neurofibromatosis. **Arch. Ophthalmol**., v. 109, p. 662-666, 1991.

DIAS, A. F. B. C., ABREU, M. P. Q., TORRES, R. J. A., GANTOINS, A. P. P. Neurofibromatose de Von Recklinghausen - a propósito de dois casos. **Arq. Instituto Penido Burnier**, v. 28, n. 1, p. 54-57, 1988.

DIEHL, S. R., BOEHNKE, M., ERIKSON, R. P., BAXTER, A. B., BRUCE, M. A., LIEBERMAN, J. L., PLATT, D. J., PLOUGHMAN, L. M., SEILER, A. M., SWEET, A. M., COLLINS, F. S., Linkage analysis of von Recklinghausen neurofibromatosis to DNA markers on chromosome 17. **Genomics**, v. 1, p. 361-363, 1987

DIEHL, S. R., BOEHNKE, M., ERICKSON, R.P., PLOUGHMAN, L.M., SEILER, K.A., LIEBERMAN, J.L., CLARKE, H.B., BRUCE, M.A., SCHRRY, E.K., PERICAK-VANCE, M., O'CONNEL, P., COLLINS, F.S. A refinated genetic maps of the region of chromosome 17 surrounding the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene. **Am. J. Human. Genet.,** v. 44, p. 33-37, 1989.

DOERJER, G., BEDELL, M. A., DESCH, F. DNA adducts and their biological relevance. **In**: Obe, G. ed. **Mutation in man.** Berlin, Springer-Verlag, p.20-34, 1984.

DUKE-ELDER, S. S., WIBAR, K. C. **System of ophthalmology the anatomy of the visual system.** Ed. Henry Krimpton, London, volume II, 1961, 901p.

DUNN, D. W. Neurofibromatosis in childhood. **Curr. Probl. Pediatr.**, v. 17, n. 8, p. 445-497, 1987.

DUNN, D. W., ROOS, K. L. Magnetic resonance imaging evaluation of learning difficulties in neurofibromatosis. **Neurofibromatosis**, v.2, p. 1-5, 1989.

DUTRILLAUX, B., GERBAULT-SEUREAU, M., ZAFRANI, B., PRIEUR, M. Prolonged G2 phase of breast cancer cells and chromosome damage. **Eur. J. Cancer**, v. 27, p. 1307-1312, 1991.

EGBUONU, L. STARFIELD, B. Child health and social status. **Pediatrics**, v. 69, p. 550-557, 1982.

EHRENFELD, G. M., MURUGESAN, N., HECHT, S. M. Activation of oxygen and mediation of DNA degradation by manganese-bleomycin. **Inorg. Chem.**, v. 23, p. 1496-1498, 1984.

EHRENFELD, G. M., RODRIGUEZ, L. O., HECHT, S. M., CHANG, C., BASUS, V. J., OPPENHEIMER, J. Copper (I)-bleomycin:structurally unique complex that mediates oxidative DNA strand scission. **Biochemistry**, v. 24, p. 81-92, 1985.

ELDRIDGE, R. DENCKLA, M. B., BIEN, E. MYERS, S., KAISER-KUPFER, M. I., PIKUS, A., SCHLESINGER, S. L., PARRY, D. M., DAMBROSIA, J. M., ZASLLOF, M. A., MULVIHILL, J. J. Neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen´s disease). **Am. J. Diseases Children**, v. 143, p. 833-837, 1989.

ELIASON, M. J. Neurofibromatosis implications for learning and behaviour. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 7, p. 175-179, 1986.

ELIASON, M. J. Neuropsychological patterns: neurofibromatosis compared to developmental learning disorders. **Neurofibromatosis**, v. 1, p. 17-25, 1988.

ENZINGER, F. M., WEISS, S. W. Soft tissue tumors. St Louis. **C. V. Mosby**, p. 625-652, 1983.

ESCALONA, S. K. Babies at double hazard: early development in infantis at biologic and social risck. **Pediatrics**, v. 70, p. 670-676, 1982.

ESTIVIL, E., LAZARO, C., CASALES, C., RAVELLA, A. Recurrence of a nonsense mutation in the NF1 gene causing classical neurofibromatosis type 1. **Hum. Genet.**, v. 88, p. 185-188, 1991.

EVANS, D. G. R., HUSON, S. M., NEARY, W. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. **Q. J. Med.**, v. 304, p. 603-618, 1992.

FAIN, P. R., BARKER, D. F., GOLDGAR, D. E., WRIGHT, E., NGUYEN, K., CAREY, J., JOHNSON, J., KIVLIN, J., WILLARD, H., MATHEW, C., PONDER, B., SKOLNICK, M. Genetic analysis of NF1. Identification of close flanking markers on chromosome 17. **Genomics**, v. 1, p. 340-345, 1987.

FAINTUCH, J. J., SAITO, R., WARTH, M. P. T. N., ROCHA, A. S. Comprometimento pulmonar letal na neurofibromatose. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 45, n. 5, 1990.

FAIRBANK, J. Orthopaedic manifestations of neurofibromatosis, **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Hapman & Hall medical, New York, 1994, p. 275-304.

FARBER, E., RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2751-2760, 1991.

FEARON, E. R. Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence. **Advances in Internal Medicine**, v. 39, p. 123-147, 1994.

FEINMAN, N. L., YAKOVAC, W. C. Neurofibromatosis in childhood. **J. Pediatr.**, v. 76, p. 339, 1970.

FERNER, R. E. Intellect in neurofibromatosis 1 e medical complications of neurofibromatosis 1. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 233-252 e p. 316-330.

FIEDLER, W., GLAUSSEN O., LUDECKE, H. J., SENGER, G., HERSTHEMKE, B., GEURTS van KESSEL, A., GOORTZEN, W., FAHSOLD, R. New markers for the neurofibromatosis 2 region generated by microdissection of chromosome 22. **Genomics**, v. 10, p. 786-791, 1991.

FITZPATRICK, T. B., MARTUZA, R. L. Clinical diagnosis of von Rechlinghausen´s neurofibromatosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 486, p. 383-385, 1986.

FITZPATRICK, A. P., EMANUEL, R. W. Familial neurofibromatosis and hypertrophic cardiomyopathy. **Br. Heart. J.**, v. 60, p. 247-251, 1988.

FOUNTAIN, J. W., WALLACE, M. R., BRUCE, M. A., SEIZINGER, B. R., MENON, A. G., GUSELLA, J. F., MICHELS, V. V., SCHMIDT, M. A., DEWALD, G. W., COLLINS, F. S. Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. **Sciense**, v. 244, p.1085-1087, 1989.

FOUNTAINE, B., HANSON, M. P., VONSOTTEL, J. P., MARTUZA, R. L., GUSELLA, J. F. Loss of chromosome 22 alleles in human sporadic spinal schwannomas. **Ann. Neurol.**, v. 29, p. 183-196, 1991a.

FOUNTAINE, B., SASON, M., DELATTRE, O., MENON, A., ROULEAU, G. A., SEIZINGER, B. R., JEWELL, A. F., HANSON, M. P., AURIAS, A., MARTUZA, R. L.,

GUZELLA, J. E. Parental origin of chromosome 22 loss in sporadic and NF2 neuromas. **Genomics**, v. 10, p. 280-283, 1991b.

FRANCESCHI, C., MONTI, D., SCARFI, M. R., ZENI, O., TEMPERANI, P., EMILIA, G., SANSONI, P., LIOLI, M. B., TROIANO, L., AGNESINI, C., SALVIOLI, S., COSSARIZZA, A. Genomic instability and aging. Studies in centenarians (successful aging) and in patient with Down´s syndrome (accelerated aging). **Ann. N. Y. Acad. Sciences**, v. 663, p. 4-16, 1992.

FRANCK-STROMBORG, M. Neurofibromatosis. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 8, n. 4, p.265-271, 1992.

FRIAS, S., MENDOZA, S., MOLINA, B., CARNEVALE, A. Effect of mitomycin C and bromodesoxyuridine on Fanconi anemia lymphocytes. **Ann. Genet.**, v. 34, n. 2, p. 104-107, 1991.

FÜELLER, V. BOLTSHAUSER, E., KIICHHOFER, A. Iris hamartomata as diagnostic criterion in neurofibromatosis. **Neuro-pediatrics**, v. 17, p. 183-185, 1986.

GEIST, J. R., GANDER, D. L., STEFANAC, S. J. Oral manifestations of neurofibromatosis types I e II. **Oral Surg. Oral Med Oral Pathol**, v. 73, p. 376-382, 1992.

GIACCIA, A. J., DENKO, N., MacLAREN, R., MIRMAN, D., WALDREN, C., HART, I., STAMATO, T. D. Human chromosome 5 complements the DNA doublestrand break-repair deficiency and gamma-ray sensitivity of the XR-1 hamster variant. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 47, p. 459-469, 1990.

GINSBURG, D. S., HERNANDEZ, E., JOHNSON, J. W. C. Sarcoma complicating von Recklinghausen disease in pregnancy. **Obstet. Ginecol**, v. 58, p. 38-387, 1981.

GLOVER, T. W., STEIN, C. K., LEGIUS, E., ANDERSEN, L. B., BRERETON, A. Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklighausen neurofibromatosis. **Genes, Chrom. Cancer**, v. 3, 62-70, 1991.

GOLDBERG, N.S., COLLINS, F.S. The hunt for the neurofibromatosis gene. **Arch. Dermatol.**, v. 127, p. 1705-1707, 1991.

GONZAGA, H. F. S., SABATINI, L. S. G. Manifestações da neurofibromatose múltipla. Doença de von Recklinghausen. **An. bras. Dermatol**, v. 66, n. 2, p. 77-80, 1991.

GOUDIE, S. M., BURT, A. D., BOYLE, P. MacFARLANE, G., BIRNIE, G. G., MILLE, P. R., GILLIS, C. R., MacSWEEN, R. N. M., WATKINS, G. Breast cancer in women with primary biliary cirrhosis. **Br. Med J**, v. 291, p. 1597-1598, 1985.

GOULD, R. D., HILAL, S. K., CHUTORIAN, A. M. Efficacy of radiotherapy in optic gliomas. **Pediatr. neurol.**, v. 3, p. 29-32, 1987.

GRANDBERG-OHMAN,I., BRISMAR, B., LINDHOLM, A.C. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in von Recklinghausen's disease - a family study. **Hereditas,** v. 108, p. 93-96, 1988.

GRANT, W. M., WALTON, D. S. Distinctive gonioscopic feridings in glaucoma due to neurofibromatosis. **Arch. Ophthalmol.**, v. 79, p. 127-134, 1968.

GRAYSON, M. **Enfermedades de la córnea**. Editorial Medica Panamericana, São Paulo, segunda edición, 1985, 632p.

GRETZULA, J. C., WEBER, P. J. McGREG, J. M. Multiple in a lolized area. **Arch Dermatol.**, v. 124 p. 1101-1105, 1988.

GRIFFITHS, D., WILLIAMS, G. T., WILLIAMS, E. D. Multiple endocrine neoplasia associated with von Recklinghausen´s disease. **British Med. J.**, v. 287, p. 1341-1343, 1983.

GUNDY, S., BAKI, M., BODROGI, I., CZEIZEL, A. Persistence of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of testicular cancer patients I. The effect of vinblastine, cisplatin and bleomycin adjuvant therapy. **Oncology**, v. 47, p. 410-414, 1990.

GUTMANN, D. H., COLLINS, F. S. Recent progress toward understanding the molecular biology of von Recklinghausen neurofibromatosis. **Annals of neurology**, v 31, n. 5, 1992.

HAFEZ, M., SHARAF, L., EL-NABI, S.M.A., EL-WEHEDI, G. Evidence of chromosomal instability in neurofibromatosis. **Cancer,** v. 55, p. 2434-2436, 1985.

HAFEZ, M., EL-NABI, S. M. A., EL-WEHEDI, G., AL-TONBARY, Y. Enhanced response to the induction of sister chromatid exchange by gamma radiation in neurofibromatosis. **Cancer**, v. 57, p. 1937-1940, 1986.

HALL, B. D. Congenital lid ptosis associated with neurofibromatosis. **Am. J. Med. Genet.**, v. 25, p. 595-597, 1986.

HALL, J. G., ALLANSON, J. E. Neurofibromatosis 1: predicting the relation of gene structure to gene function. **Am. J. Med. Genet.**, v. 38, p. 135, 1991.

HANNAN, M. A., SMITH, B. P., SIGUT, D., SACKEY, K. Radiosensitivity of fibroblasts obtained from a café-au-lait spot and normal-appearing skin of a patient with neurofibromatosis (NF-6). **Cancer Genet Cytogenet**, v. 47, p. 191-196, 1990.

HANSSON, K., KIHLMAN, B. A., TANZARELLA, C., PALITTI, F. Influence of caffeine and 3-aminobenzamide in G2 on the frequency of chromosomal aberrations induced by thiotepa mitomycin C and N-methyl-N-nitro-N´-nitrosoguanidine in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 126, p. 251-258, 1984.

HARTLEY, AL. L., BIRCH, J. M. KELSEY, A. M., HARRIS, M., JONES, P. H. M. Sarcomas in the generations of a family with neurofibromatosis. **Cancer Genet. Cytogenet**., v. 45, p. 245-248, 1990.

unesp

HARTNANN, A., BERENDES, K., BERLIT, P. Ptosis in the differential diagnosis of neurologic diseases. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, v. 182, p. 113-120, 1983.

HAY, J., SHAHZEIDI, S., LAURENT, G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. **Arch. Toxicol.**, v. 65, p. 81-84, 1991.

HEARTLEIN, M. W., TSUJI, H., LATT, S. A. 5-Bromodesoxyuridine dependent increase in sister-chromatid exchage formation in Bloom's syndrome is associated with reduction in topoisomerase II activity. **Exp. Cell. Res.**, v. 169, p. 245-254, 1987.

HEIM, S. Spontaneous and mitomycin C induced structural chromosome aberration in lymphocyte cultures from patients whit adenomatoses of the colon and rectum. **Hereditas,** v. 103, p. 235-238, 1985.

HEIMANN , R., VERHEST, A., VERSCHRAEGEN, J., GROSJEAN, W., DRAPS, J. P., HECHT, F. Hereditary intestinal neurofibromatosis. I. A distintive genetic disease. **Neurofibromatosis**, v. 1, p 26-32, 1988.

HILAL, S. K., SOLOMAN, G. E., GOLD, A. P., CARTER, S. Primary cerebral arterial scclusive disease in children, parts I and II. **Radiology**, v. 99, p. 71-94, 1971.

HITTELMAN, W. N., SEN, P. Heterogeneity in chromosome damage and repair rates after bleomycin in ataxia telangiectasia cells. **Cancer Res**, v. 48, p. 276-279, 1988.

HOLLANDER, M., WOLFE, D. A. **Nonparametric statistical methods.** John Wiley & Sons, New York, 1973, 503p.

HOLT, J. F., KUHNS, L. R. Macrocranium and macroencephaly in neurofibromatosis. **Skeletal Radiol**, v. 1, p. 25-28, 1976.

HOO, J. J. Alternative explanations for recurrent achondroplasia in siblings with normal parents. **Clin. Genet.**, v. 25, p. 553-554, 1984.

HOPE, D.G., MULVIHILL, M. Malignancy in neurofribromatosis. **Adv. Neurol.,** v. 29, p. 33-56, 1981.

HOU, De-Y., MARUYAMA, Y., DRAGO, J. R. Chromosome aberrations of human small cell lung cancer induced by a new in-bleomycin complex. **Journal of Surgical ncology**, v. 51, p. 236-242, 1992.

HOYT, W. F., BAGHDASSARIAN, S. A. Optic glioma of childhood: natural history and rationale for conservative management. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 53, p. 793-798, 1969.

HSIA, Y. E., HIRSCHHORN, K. **Couseling in Genetics**. Alan R. Liss, New York, p. 1-29, 1979.

HSU, T.C. Genetic instability in the humam population: a working hypothesis. **Hereditas**, v. 98, p. 1-9, 1983.

HSU, T.C. Genetic susceptibility to carcinogenesis. **The Cancer Bolletin**, v. 38, n. 3, p. 125-128, 1986.

HSU, T. C., RAMKISSOON, D., FURLONG, C. Differential susceptibility to a mutagen among human individuals: Synergistic effect on chromosome damage between bleomycin and aphidicolin. **Anticancer Res**, v. 6, p. 1171, 1176, 1986b.

HSU, T.C. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensivity. **In Vitro,** v. 23, p. 591-603, 1987.

HSU , T.C., JOHNSTON, D.A., CHERRY, L.M., RAMKISSOON, D. SCHANTZ, S.P., JESSUP, J.M., WINN, R.J., SHIRLEY, L., FURLONG, C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomicin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. **Int. J. Cancer,** v. 43, p. 403-409, 1989.

HUGHES, R. A. C. Neurological complications of neurofibromatosis 1. **In**: HUSON, s. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 204,232.

HURST, J. W., LOGUE, R. B., RACKLEY, C. E., SCHLANT, R. C., SONNENBLICK, E. K., WALLACE, A. G., WENGER, N. K. **O coração artérias e veias.** Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, sexta edição, 1990, 1558p.

HUSON, S. M., THRUSH, D. C. Central neurofibromatosis. **Quarterly J. Med., New Series**, v. 55, n. 218, p. 213-224, 1985.

HUSON, S.M., HARPER, P.S.COMPSTON, A.S. Von Recklinghausen neurofibromatosis - a clinical and population study in southeast males. **Brain,** v. 111, p. 1355-1381, 1988.

HUSON, S. M. Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 64, p. 745-749, 1989.

HUSON, S. M., COMPSTON, D. A. S., CLARK, P., HARPER, P. S. **J. Med. Genet.**, v. 26, p. 704-711, 1989.

HUSON, S. M. 1. Neurofibromatosis: historical perspective, classification and diagnostic criteria. 7. Neurofibromatosis 1: a clinical and genetic overview. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis a pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 1-22 e p. 160-203.

HUSON, S. M., UPADHYAYA, M. Neurofibromatosis 1: clinical management and genetic couseling. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 355-381.

IBGE. **Sinopse preliminar do censo demográfico de 1991**. Publicação da Fundação Instituto Brasileiro de Geiografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro, 1991, 233p.

unesp

IIJIMA, K., MURIMOTO, K., KAISUMI, A., HIGURASHI, M., HIRAYAMA, M. Bleomycin-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Down lymphocyte cultures. **Hum. Genet.**, v. 66, p. 57-61, 1984.

ISCN: An international system for humam cytogenetic nomenclature (1978). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 21, p. 309-404, 1978.

ISCN (1985) An international system for human cytogenetics nomenclature. Harnden D. G., klinger, H.P.(eds) Published in colaboration with **Cytogenet Cell Genet**, Karger, Basel.

ISHII, Y. Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister-chromatid exchange. **Mut. Res.**, v. 91, p. 51-55, 1981.

JAAKKOLA, S., MUONA, P., JAMES, W. D. **et al.** Segmental neurofibromatosis: immunocytochemical analysis of cutaneous lesions. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 22, p. 617-621, 1990.

JACKSON, I. T., LAWS, E. R., MARTIN, R. D. The surgical management of orbital neurofibromatosis. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 71, p. 751-758, 1983.

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 origem of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. **Nature**, v. 343, p. 558-559, 1990.

JAKOBIEC, F. A., FONT, R. L., ZIMMERMAN, L. E. Malignant peripheral nerve sheath tumors of the orbit: a clinico-pathologic study of eight cases. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, v. 83, p. 332-366, 1985.

JOHNSON, B. L., CHARNECO, D. L. Café-au-lait spots in neurofibromatosis and in normal individuals. **Arch. Dermatol.**, v. 102, p. 442-446, 1970.

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

JUNG, E. Segmental neurofibromatosis (NF-5). **Neurofibromatosis**, v. 1, p. 306-311, 1988.

KAISER-KUPFER, M. I., FREIDLIN, V., DATILES, M. B. The association of posterior capsular lens opacity with bilateral acoustic neuromas in patients with neurofibromatosis type. **Arch ophthalmol.**, v. 197, p. 541-544, 1989.

KAPLAN, P., ROSENBLATT. B. A distinctive facial appearance in neurofibromatosis von Recklinghausen. **Am. J. Med. Genet**, v. 21, p. 463-470, 1985.

KAPLAN, D., PESTANA, A. Cutaneous segmental neurofibromatosis. **South Med. J.**, v. 82, p. 516-517, 1989.

KEATS, T. E., Atlas of normal roentgen variants that mary simulated disease. Fifth edition. Mosby year book, **Inc. St. Louis**., 1992, 983p.

KELLY, M. J., JOHNSON , B. E. Genetic mechanisms of solid tumor oncogenesis. **Advances in Internal Medicine**, v. 39, p. 93-122, 1994.

KHOUZAM, M. N., TSIOUPRA, K., DELHANTY, J. D. A. Chromosome breakage in lymphocytes from members of cancer families showing autossomal dominant inheritance. **Clinical Genetics**, v. 38, p. 51-56, 1990.

KINSELLA. T. J., LITLE, J. B., NOVE, J., WEICHSELBAUM, R. R., LI, F. R., MEYER, R. J., MARCHETTO, D. J., PATTERSON, W. B. Heterogeneous response to X-ray and ultraviolet irradiations of cultured skin fibroblasts in two families with gardner´s syndrome. **J. Matl. Cancer Inst.**, v. 68, p. 697-701, 1982.

KNUDSON, A. G., STRONG, L.C. Mutation and cancer: a model for Wilms´ tumor of the kidney. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 48, n.2, p. 313-322, 1972.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. **Cancer**, v. 63, n. 10, p. 1888-1891, 1989.

KOBERLE, B., SPEIT, G. Molecular characterization of mutations at the hprt locus in V79 chinese hamster cells induced by bleomycin in the presence of inibitors of DNA repairs. **Mutat. Res.**, v. 249, p. 161-167, 1991.

KOEDIJIK, J. Segmental neurofibromatosis. **Br. J. Dermatol.**, v. 117, p. 790-791, 1987.

KORENBERG, J. R., FREEDLANDER, E. F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. **Chromosoma**, v. 48, p. 355-360, 1974.

KOROLKOVAS, A., BURCKHAETER, J. A. Agentes Antioneoplásicos. **In: Química Farmaceutica**, Rio de Janeiro, Guanabara Dois, p. 618-648, 1982.

KOUL, R., MOTTA, A., RAZDAN, S. Prevalence of neurofibromatosis with neurologic symptons in Kashmir, India, in 1986. **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 127-128, 1989.

KRIKUN, M. E. **Imaging modalities in spinal disorders**. W. B. Sounders Company Philadelphia, 1988, 691p.

KROHEL, G. B. Localized orbital neurofibromas. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 100, p. 458-464, 1985.

KUNVINK, K., CERVENTA, J. Acrocentic prophasing in bromodesoxyuridine incorporated chromosomes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, p. 265-271, 1990.

KUVAHARA, J., SUZUKI, T., SUGIURA, Y. Effective DNA cleavage by bleomycin-vanadium complex plus hydrogen peroxide. **Biochem Biophys. Res. Comm.**, v. 129, p. 368-374, 1985.

LANDIM, E., PUERTAS, E. B., JACOB, A. E. L., MARTINS, B. Cifose cervical por neurofibromatose - apresentação de um caso. **Folha Médica**, v. 94, n. 6, p. 381-383, 1987.

LEGIUS, E., MARCHUK, D.A., COLLINS, F.S., GLOVER, T.W. Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypotesis. **Nature Genet.**, v. 3, p. 122-126, 1993.

LEONARD, J. C., MERZ. Repair of singke-stranded breaks in normal and trisomy lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 105, p. 417-422, 1982.

LEONARD, J. C., MERZ, T. Repair of single-stranded breaks in normal and trisomy lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 105, p.417-422, 1983.

LEWIS, R. A., RICCARDI, V. M. Von Recklinghausen neurofibromatosis. Incidence of iris hamartomata. **Ophthalmology**, v. 88, n. 4, p. 348-354, 1981.

LEWIS, R. A., GERSON, L. P., AXELSON, K. A., RICCARDI, V. M., WHITFORD, R. P. Von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. **Ophthalmology**, v. 91, p. 929-935, 1984.

LI, S., AU, W. W., SCHMOYER, R.L., HSU, T.C. Baseline and mitomicyn C induced sister chromatid exanges in a melanoma and a colon tumor cell line. **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 6, p. 243, 1982.

LI, M. J., SHIRAISHI, Y. A uniquehuman mutant B-lymphoblastoid cell lina (ataxia telangiectasia) wich exhibits increased sister-chromatid exchange retaining hypersensitivity to neocarzinostatin and bleomycin. **Mutat. Res.**, v. 230, p. 167-175, 1990.

LIANG, J. C., PINKEL, D. P., BAILEY, N. M., TRUJILLO, J. M. Mutagen sensitivity and cancer susceptibility. **Cancer**, v. 64, p. 1474-1479, 1989.

LISTERNICK, R., CHAROOW, J., GREENWALD, M. J., ESTERLY, N. B. Optic glioma in children with neurofibromatosis type I. **J. Pediatr.**, v. 114, p. 788-792, 1989.

LISTERNICK, R., CHARROW, J. Neurofibromatosis type 1 in chilhood. **The Journal of Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 845-853, 1990.

LITTLE, J. B., NOVE, J., WEICHSELBAUM, R. R. Abnormal sensitivity of diploid skin fibroblasts from a family with gardner´s syndrome to the lethal effects of X-irradiation, ultraviolet light and mitomycin-C. **Mutat. Res.**, v. 70, p. 241-250, 1980.

LOEB, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 51, p. 3075-3079, 1991.

LOPEZ-LARRAZA, D., DcLUCA, J. C., BIANCHI, N. O. The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 232, p. 57-61, 1990.

LOPEZ-LARRAZA, D. M., BIANCH, N. O. DNA response to bleomycin in mammalian cells with variable degrees of chromatin condensation. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v 21, p. 258-264, 1993.

LUBS, M. L. E., BAUER, M. J., FORMAS, M. E., DJOKIC, B. Lisch Nodules in neurofibromatosis type 1. **New Engl. J. Med.**, v. 324, n. 18, p. 1264-1266, 1991.

LUCCA, E. J., BARTHOLOMEI, H. L. Genetic Susceptibility to bleomycin: a twin study. In press, 1993.

LUND, A. M., SKOVBY, F. Optic gliomas in children with neurofibromatosis type 1. **Eur. J. Pediatr.**, v. 150, p. 835-838, 1991.

MacLAREN, R. A., AV, W. W., LEGATOR, M SM. The effect of 3-aminobenzamide on X-ray induction of chromosome aberration in Down syndrome lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 222, p. 1-7, 1989.

MANNS, M., GERKEN, G., KYRIATSOULIS, A., TRAUTWEIN, C., RESKE, K., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. Two different subtypes of antimitochondrial antibodies are associated with primary biliary cirrhosis: identification and caracterization by radioimmunoblating and immunobloting. **Hepatology**, v. 7, p. 893-899, 1987.

MARCHUK, D. A., SAULINO, A. M., TAVAKKOL, R., **et al.** cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. **Genomics**, v. 11, p. 931-940, 1991.

MARCHUK, D. A., COLLINS, F. S. Molecular genetics of neurofibromatosis 1. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A phatogenic and clinical overviw**. Chapman & Hall Medical, New York, 1994, p. 23-49.

MARSHAL, C. J. Tumor suppressor genes. **Cell**, v. 64, p. 313-326, 1991.

MARTIN, R. W., NELDNER, K. H., BOYD, A. S., COATES, P. W. Multiple cutaneous granular cell tumors and neurofibromatosis in childhood. A case report and review of the literature. **Arch. Dermatol.**, v. 126, p. 105-1056, 1990.

MARTLEY, A.L., BIRCH, J.M., KELSEY, A.M., HARPIS, M., JONES, P.H.M. Sarcomas in three generations of a family with neurofibromatosis. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 45, p. 249-253, 1990.

MARTUZA, R. L., OJEMANN, R. G. Bilateral acoustic neuromas: clinical aspects, pathogenesis and treatment. **Neurosurgery**, v. 10, p. 1-12, 1982.

MARTUZA, R. L. Genetics in neurology. **Clin. Neurosurg.**, v. 31, p. 417-440, 1984.

MARTUZA, R. L., PHILIPPE, I., FITZPATRICK, T. B., ZWAAN, J., YOSHIHITO, S., LEDERMAN, J. Melanin macroglobules as a celular marker of neurofibromatosis: A quantitative study. **J. Invest. Dermatol**, v. 85, p. 347-350, 1985.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18

MATSUMARA, H., WATANABE, K., OHTA, T. O-Vanillin enhances chromosome aberrations induced by alkylating agents in cultured chinese hamster cells. **Mutat. Res.**, v. 298, p. 163-168, 1993.

MAUTNER, V. F., UMNUS-SCHNELLE, S., KOPPEN, J. HEISE, U. Diagnosis of Recklinghausen´s neurofibromatosis. **Deutsch. Med. Wochenschr.**, v. 113, p. 1149-1151, 1988.

McKUSICK, V.A. **Mendeliam Inheritance in Man**. 10 ed., Baltimore, The Johns Hopkins Univ. Press, 1400p, 1990.

McKUSICK, V.A. **Mendeliam Inheritance in Man**. 10 ed., Baltimore, The Johns Hopkins Univ. Press, 1741p, 1992.

MEINECKE, P. Evidence that the "neurofibromatosis noonan syndrome" is a variant of von Recklinghausen neurofibromatosis. **Am. J. Med. Genet.**, v. 26, p. 741-745, 1987.

MENDEZ, H. M. M. The neurofibromatosis-noonan syndrome. **Am J. Med. Genet.**, v.21, p. 471-476, 1985.

MENON, A. G., ANDERSEN, K. M., RICCARDI, V. M., CHUNG, R. Y., WHALEY, J. M. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibromas in von Recklinghausen neurofibromatosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA, v. 87, p. 5435-5439, 1990.

MIKOL, D. D., et al. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. **J. Cell. Biol.**, v. 110, p. 471-479, 1990.

MILLER, R. W. Neoplasia and Down´s syndrome. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 171, p. 637-644, 1970.

MILLER, N. R., ILIFF, W. J., GREEN, W. R. Evaluation and management of gliomas of the anterior visual pathways. **Brain**, v. 97, p. 743-754, 1974.

MILLER, R. M., SPARKES, R. S. Segmental neurofibromatosis. **Arch. Dermatol.**, v. 113, p. 837-838, 1977

MILLS, P. R., BOYLE, P., QUIGLEY, E. M. M., BIRNIE, G. G., JARRET, F. WATKINS, G., MacSWEEN, R. N. M. PBC: an increased incidence of extrahepatic malignancies. **J. Clin. Pathol.**, v. 35, p. 541-543, 1982.

MOMOSE, K. J., NEW, P. F. J. Non-atheromatous stenosis and acclusion of the internal carotid artery and its main branches. **A. J. R.**, v. 118, p. 550-566, 1973.

MORIMOTO, K. KANEKO, T., LIGIMA, L. KOIZUMI, A. Proliferation kinetics and chromosome damage in trisomy 21 lymphocyte cultures exposed to X-rays and bleomycin. **Cancer Res.**, v. 44, p. 1499-1504, 1984.

MORRIS, S. M. The genetic toxicology of 5-bromodesoxyuridine in mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 258, p. 161-188, 1991.

MORRISSY, R. T. Congenital pseudoarthrosis of the tibia. A long-term follow-up study. **Clinical Orthop.**, v. 166, p.14-20, 1982.

MOSSO, M. L., CASTELLO, M., BELLANI, F. F., DITULLIO, M. T., LOIACOMO, F., PAOLUCCI, G., TAMARO, P., TERRACINI, B., PASTORE, G. Neurofibromatosis and malignant childhood cancer: a survey in italy, 1970-83. **Tumori**, v. 73, p. 209-212, 1987.

MULVIHIL, J. J., PARRY, O. M., SHERMAN, J. L., PIKUS, A., KAISER-KUPFER, M. I., ELDRIDGE, R. Neurofibromatosis 1 (Recklinghausen disease) anel neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). **Ann. Inter. Med**., v. 113, p. 39-52, 1990.

MURTY, V. V. V. S., MITRA, A. B., SHARMA, A., DAS, B. C., LUTHRA, V. K. Mitomycin C induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCEs) in lymphocytes of patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. **Neoplasma,** v. 34, n. 1, p. 101-105, 1987.

NATARAJAN, A.T. Mutagenesis and chromosome changes review. **In**: Broerse, J.J., Barendsen G., Kal H.B. and Vanderkogel A.J. (Eds.), **Radiation Research**, Proc. 7th Int. Congr. Rad. Res., p. 239-247, 1983.

NATARAJAN, A. T., TATES, A. D., MEIJERS, M. NEUTEBOOM, I. VOGEL, N. Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methyl methanesulfonate in chinese hamster ovary cells. **Mutat Res.**, v. 121, p. 211-223, 1983.

NATARAJAN, A. T., DARROUDI, F., MULLENDERS, L. H. F., MEIJERS, M. The nature and repair of DNA lesions that lead to chromossomal aberrations induced by ionizing radiations. **Mutat. Res.**, v. 160, p. 231-236, 1986.

NEVILLE, B. W., HANN, J., NARANG, R., GAREN, P. Oral neurofibrosarcoma associated with neurofibromatosis type I. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 72, p. 456-461, 1991.

NIH. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis. **Arch. Neurol.**, v. 45, p. 575-578, 1988.

NOGAMI, A., HIROE, M., MARUMO, F. Regional sympathetic denervation in von Racklinghausen´s disease with coronary spasm and myocarditis. **International Journal of Cardiology**, v. 32, p. 397-400, 1991.

NORA, J. J., FRASER, F. C. **Genética Médica**, 3 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, 301p.

NORMAN, M. E. Neurofibromatosis in a family. **Am. J. Dis. Child.**, v. 123, p. 159, 1972.

unesp

NOTGHI, A., NESTLE, V., RITTNER, G., BRISSOT, P., JOVANOLLE, H., MANNS, M., SCHLEIER-MACHER, E., RITTNER, C. Chromosomal aberrations in patients with primary biliary cirrhosis. **Hum. Genet.**, v. 85, p. 540-550, 1990.

O'CONNEL, P., LEACH, R.J., LEDBETTER, D.H., CAWTHON, R.M., CULTER, M., ELDRIDGE, J.R., FREJ, A.K., HOLM, T.R., WOLFF, E., THAYER, M.J., SCHAFER, A.J., FOUNTAIN, J.W., WALLACE, M.R., COLLINS, F.S., SKOLNICK, M.H., RICH, D.C., FOURNIER, R.E.K., BATY, B.J., CAREY, J.C., LEPPERT, M.F., LATHROP, G.M., LALOVEL, J.M., WHITE, R. Fine structure DNA mapping studies of the chromosomal region harboring the genetic defect in neurofibromatosis type I. **Am. J. Hum. Genet.,** v. 44, p. 51-57, 1989.

O´CONNEL, P. et al. The human homolog of murine Evi-2 lies between two von Recklinghausen neurofibromatosis translocations. **Genomics**, v. 7, p. 547-554, 1990.

OPITZ, J. M., WEAVER, D. D. The neurofibromatosis-noonan syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 21, p. 477-490, 1985

ORANJE, A. P. VUZEVSKI, V. D., KALIS, T. J., ARTS, W. F. M., JOOST, T. V., STOLZ, E. Segmental neurofibromatosis. **Br. J. Dermatol.**, v. 112, p. 107-112, 1985.

OXENHANDLER, D. C., SAYERS, M. P. The dilemma of childhood optic gliomas. **J. Neurosurg.**, v. 48, p. 34-41, 1978.

PARIZEL, P. M., MARTIN, J. J., VYVE, M. Van, van den HAUWE, L., SCHEPPER, A. M. Cerebral ganglioglioma and neurofibromatosis type I. **Neuroradiology**, v. 33, p. 357-359, 1991.

PARRY, D. M., KAISER-KUPFER, M. I., SHERMAN, J. L., PIKUS, A., ELBRIDGE, R. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic or central neurofibromatosis), a treable cause of deafness. **Ann. N. Y. Acad. Science**, v. 630, p. 305-307, 1991.

PARSHAD, R., SANFORD, K. K., JONES, G. M. Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. **Proc. Natl Acad. Sci** USA, v. 80, p. 5612-5616, 1983.

PARSHAD, R., SANFORD, K. K., JONES, G. M. Chromosomal radiosensitivity during the G2 cell-cycle period of skin fibroblasts from individuls with familial cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci** USA, v. 82, p. 5460-5463, 1985a.

PARSHAD, R., SANFORD, K.K., JONES, G., TARONE, R. E. G2 chromosomal radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. **Cancer Genet. Cytogenet**, v. 14, p. 163-168, 1985b.

PASTORES, G. M., MICHELS, V. V., JACK, C. R. Early childhood diagnosis of acoustic neuromas in presymptomatic indivuduals at risk of neurofibromatosis 2. **Am. J. Med. Genet.**, v. 41, p. 325-329, 1991.

PATHAK, S., DHALIWAL, M. K., HOPWOOD, V. L. Genetic susceptibility, somatic mosaicisms and predisposition to human cancer. **Anticancer Research**, v. 9, p. 17-20, 1989.

PELLOCK, J. M., KLEINMAN, P. K., McDONALD, B. M., WIXSON, D. Childhood hipertensive stroke with neurofibromatosis. **neurology**, v. 30, p. 656-659, 1980

PENSAK, M. L., KEITH, R. W., DIGNAN, P. S. J., STOWENS, D. W., TOWBIN, R. B., KATBAMNA, B. Neuroaudiologic abnormalities in patients with type 1 neurofibromatosis. **Laryngoscope**, v. 99, p. 702-706, 1989.

PERICAK-VANCE, M. A., YAMAOKA, L. H., VANCE, J. M., SMALL, K., ROSENWASSER, G. O. D., GASKELL, P. C., HUNG, W. Y., ALBERTS, M. J., HAYNES, C. S., SPEER, M. C., GILBERT, J. R., HERBSTREITH, M., AYLSWORTH, A. S., ROSES, A. D. Genetic linkage studies of chromosome 17 RFLPS in Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1). **Genomics**, v. 1, p. 349-352, 1987.

PERRY, H. D., FONT, R. L. Iris nodules in von Recklinghausen´s neurofibromatosis. Electron microscopic confirmation of their melanocytic origem. **Arch. Ophthalmol.**, v. 100, p. 1635-1640, 1982.

POLLACK, C. V., PENDER, E. S. Recognizing an index case of type 1 neurofibromatosis. **American Family Physician**, v. 45, n. 2, p. 623-628, 1992.

POMIER, Y., RUNGER, T. M., KERRIGAN, D., KRAEMER, K. H. Relationsship of DNA strand breakage produced by bromodesoxyuridine to topoisomerase II activity in Bloom-syndrome fibroblasts. **Mutat. Res.**, v. 254, p. 185-190, 1991.

PONDER, B. Neurofibromatosis gene cloned. **Nature**, v. 346, p. 703-704, 1990.

POVIRK, L. F., AUSTIN, M. J. F. Genotoxicity of bleomycin. **Mutat. Res.**, v. 257, p. 127-143, 1991.

PRESTON, R. J. X-ray-induced chromosome aberrations in Down syndrome lymphocytes: an explanation of their increased sensitivity. **Environ. Mutagen**, v. 3, p. 85-89, 1981.

PULALLARA, T. J., GREESON, J. D., STOKER, G. L. Cutaneous segmental neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 13, p. 999-1003, 1985.

PULST, S. M. Prenatal diagnosis of the neurofibromatosis. **Clin. Perinatol.**, v. 17, p. 829-844, 1990.

PURVIN, V. A., DUNN, D. W. Ophtalmological manifestations of neurofibromatosis 1 and 2. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 253-274.

RAJ, A. S., HEDDLE, J. A. Simultaneous detection of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges. Experience with DNA intercalating agents. **Mutat. Res**., v. 78, p. 253-260, 1980.

unesp

RAWLINGS, C. E., WILKINS, R. H., COOK, W. A. Segmental neurofibromatosis. **Neurosurgery**, v. 20, p. 946-949, 1987.

RICCARDI, V. M., COHEN, A., CHEN, M. T. Genetic counseling in hospital care. **Am. J. Pub. Health**, v. 68, p. 652-655, 1978.

RICCARDI, V. M. Pathophyology of neurofibromatosis. IV Dermatological insights into heterogeneity and pathogenesis. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 3, p. 157-166, 1980.

RICCARDI, V. M., MAGOS, V. A. Characteristics of skin and tumor fibroblasts from neurofibromatosis patients. **Adv. Neurol.**, v. 29, p. 191-198, 1981.

RICCARDI, V. M. Cutaneous manifestations of neurofibromatosis: cellular interaction, pigmentation and mast cells. **Birth Defects**, v. 17, n. 2, p. 129-145, 1981a.

RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis: an overvirew and new directions in clinical investigations. **Adv. Neurol.**, v. 29, p. 1-9, 1981b.

RICCARDI, V. M. Von Recklinghausen neurofibromatosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 305, p. 1617-1627, 1981c.

RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. **Current Problems in Cancer**, v. 8, n. 2, p. 1-34, 1982.

RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis in a patient with systemic lupus erythematosus. **Arthr Rheum**, v. 26, p. 574, 1983

RICCARDI, V. M., DOBSON II, C. E., CHAKRABORT, R., BONTKE, C. The pathophysiology of neurofibromatosis: IX. Paternal age as a factor in the origem of new mutations. **Am. J. Med. Genet.**, v. 18, p. 169-176, 1984.

RICCARDI, V. M., LEWIS, R. A. Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p. 284-289, 1988.

RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis update. **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 284-291, 1989.

RICCARDI, V. M. **Neurofibromatosis phenotype, natural history, and pathogenesis.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Second edition, 1992, 498 p.

RIOPELLE, R. J., SUTTER, A. K., HARRIS-WARRICK, R. M., KLEARMAN, M., SHOOTER, E. M. Receptor interactions of nerve growth factor. **Adv. Neurol.**, v. 29, p. 133-147, 1984.

RITTER, J. L., RICCARDI, V. M. von Recklinghausen neurofibromatosis (NF-1): an argument for very high penetrance and a comparison of sporadic and inherited cases. **Ann. J. Hum. Genet.**, v. 37, p. A135, 1985

unesp

RITTNER, G., SCHWANITZ, G., BAUR, M. P., BLACK., WELSH, K. L., KUHNL, P., RITTNER, C. Family studies in scleroderma (Systemic sclerosis) demostrating an HLA-linked increased chromosomal breakage rate in cultured lymphocytes. **Hum. Genet.**, v. 81, p. 64-70, 1988.

ROBBINS, J., OTSUKA, F., TARONE, R., POLINSKY, R., BRUMBACK, R. A., NEE, L. E. Parkinson´s disease and Alzheimer´s disease: hypersensitivity to X-rays in cultured cell lines. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 48, p. 916-923, 1985.

RODENHISER, D. I. COULTER-MACHIE, M. B., JUNG, J. H., SINGH, S. M. A genetic study of neurofibromatosis 1 in South-Western Ontario. I population, familial segragation of phenotype, and molecular linkage. **Am. J. Med. Genet.**, v. 28, p. 746-751, 1991.

ROMERO, M. J., ORTEGA, M., CAMACHO, F. Is chronic diffuse hepatopathy a manifestation of neurofibromatosis? **Am. Acad. Dermatol.**, p. 1026, 1989.

ROSENBERG, N. L., DILIBERTI, J. H., ANDREWS, A. M., BUIST, N. R. M. Myotonic distrophy and hiperparathyroidism: association with neurofibromatosis and multiple endocrine adenomatosis type A. **Neurol. Neurosurgery Psych.**, v. 51, p. 1578-1580, 1990.

ROSMAN, N. P., PERACE, J. The brain in multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen´s disease): a suggested neuropathological basis for the associated mental defect. **Brain**, v. 90, p. 829-840, 1967.

ROTH, R., MARTINES, M., JAMES, W. Segmental neurofibromatosis. **Arch. Dermatol.**, v. 123, p. 917-920, 1987.

ROULEAU, G. A., WERTELECKI, W., HAINES, J. L., HOBBS, W. J., TROFATTER, J. A., SEIZINGER, B. R., MARTUZA, R. L., SUPERNEAU, D. W., CONNEALLY, P. M. GUSELLA, J. F. Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. **Nature**, v. 329, p. 246-248, 1987.

ROULEAU, G. A., SEIZINGER, B. R., WERTELECKI, W., HAINES, J. L., SUPERMEAU, D. W., MARTUZA, R. L., GUSELLA, J. F. Flanking markers bracket the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene on chromosome 22. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 46, p. 323-328, 1990.

ROULEAU, G. A., MEREL, P., LUTCHMAN, M., **et al.** Alteration a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. **Nature**, 1993; 363: 515-521.

RUBENSTEIN, A. E., BADER, J. L., ARON, A. A. Familial transmission of segmental neurofibromatosis. **Neurology**, v. 33, p. 76, 1983.

RUBENSTEIN, A., WALLACE, S., ARON, A. **et. al.** Neurological complications in 250 casos de neurofibromatosis. **Ann. Neurol.**, v. 16, n. 1, p. 133, 1984.

unesp

RUBENSTEIN, A., WALLERSTEIN, A., ARON, A., WALLACE, S. Lack of correlation of megalencephaly with learning disability in disseminated neurofibromatosis. **Am. J. Hum. Genet.**, v, 37, p. 74, 1985.

RUNGER, T. M., KRAEMER, K. H. Error-prone in vivo end joining of linear plasmid DNA by Bloom´s syndrome cells. **EMBO J.**, v. 8, p. 1419-1425, 1989.

RUSH, J. A. Optic glioma: long term follow-up of 85 histopathologically verified case. **Ophthalmology**, v. 89, p. 1213-1219, 1982.

RUSSO, A., STOCCO, A., RENZI, L., BIANCO, N., MAJONE, F. Persistence of chromosomal lesions induced in actively proliferating bone marrow cells of the mouse. **Mutat. Res.**, v. 269, p. 119-127, 1992.

SADDY, E. M. V., OBADIA, I., AZULAY, R. D. Neurofibromatose: 2ª. Revisão histórica, **An. Bras. Dermatol.** v. 60, n. 6, p. 389-394, 1985.

SADEH, M., MARTINOVITS, G., GOLDHAMMER, Y. Ocurrence of both neurofibromatosis 1 and 2 in the same individual with a rapidly progressive course. **Neurology,** v. 39, p. 282-283, 1989.

SALVADORI, A., BIGI, R., CORRADETTI, C. Recklinghausen disease and hypertrophic cardiomyopathy. Description of a case with regional hypertrophy. **Minerva Cardioangiol**, v. 34, p. 771-773, 1986.

SAMUELSSON, B., AXELSSON, R. Neurofibromatosis. A clinical and genetic studie of 96 cases in Gothenburg, Sweden. **Acta Dermatovener**, v. 95, p. 67-71, 1981.

SAMUELSSON, B., SAMUELSSON, L. Neurofibromatosis in gotheburg, Sweden. I. Background, study design and epidemiology. **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 6-22, 1989.

SAMUELSSON, B., RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis in gothemburg, sweden. III. Psichiatric and social aspects. **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 84-106, 1989a

SAMUELSSON, B., RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis in gothenburg, Sweden. III. Intellectual compromise. **Neurofibromatosis**, v. 2, p. 78-83, 1989b.

SANCHEZ CANEJO-MIR, J., HERRERA SAVAL, A. CAMACHO MARTINEZ, F. Segmental neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatol**., v. 20, p. 681-682, 1989

SANDBERG, A.A. **The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia**, 2 ed, New York, Elsevier, 1315p, 1990.

SANKARANARAYANAN, K., DUYN, A., LOOS, M. J., MESCHINI, R., NATARAJAN, A. T. Effects of sodium butyrate on X-ray and bleomycin-induced chromosome aberration in human peripheral blood lymphocytes. **Genet. Res. Camb.**, v. 56, p. 267-276, 1990.

SASAKI, Y. F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y. Effects of vanillin on sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured chinese hamster ovary. **Mutat. Res.**, v. 191, p. 193-200, 1987.

SATRAN, L., LETSON, R. D., SELJESKOV, E. L. Neurofibromatosis with congenital glaucoma e buphthalmos in a newborn. **Am. J. Dis. Child.**, v. 134, p. 182-183, 1980.

SAUTER, H., STRAUB, W., ROBMANN, H. **Atlas of the ocular fundus.** Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Second edition, 1977, 302p.

SCHANTZ, S.P., SPITS, M.R., HSU, T.C. Mutagen sensitivity head and neck cancers a biology marker for risk of multiple primary malignancies. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 82, p. 1773-1775, 1990.

SCHIEVINK, W. I., PIEPGRAS, D. G., Cervical vertebral artery aneurysms and arteriovenous fistulae in neurofibromatosis type 1: case reports. **Neurosurgery**, v. 29, n. 5, 1991.

SCHNEIDER, M., OBRINGER, A. C., ZACKAI, E., MEADOWS, A. T. Childhood neurofibromatosis: risk factors for malignant disease. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 21, p. 347-354, 1986.

SCHNEIDER, A., MAYER, V., GEBHART, E., HARMS, D., GROMBALL, J., GLOCKEL, V., BECK, J. D. Clastogen-induced fragility may differentiate pancytopenia of congenital dyskeratosis from Fanconi anaemia. **Eur. J. Pediatr.**, v. 148, p. 37-39, 1988.

SCHRADER, R., KUNKEL, B., SCHNEIDER, M., KALTENBACH, M. Hyhertrophic cardiomyopathy in a patient with von Recklinghausen neurofibromatosis. **Med. Klin.**, v. 81, p. 264-267, 1986.

SCHWARTZ, A. M., RAMOS, R. M. Neurofibromatosis and multiple nonossifying fibromas. **Am. J. Roentgenol**, v. 135, p. 617, 1980.

SCRIMGEOUR, E. M., SEN GUPTA, S. K. Neurofibromatosis in Papua, New Guinea. **Am. J. Med. Genet.**, v. 31, p. 995, 1988.

SCULLY, R. E., MARK, E. J., McNEELY, B. U. Case records of the Massachusetts General Hospital. **N. Engl. J. Med.**, v. 311, p. 520-527, 1984.

SEIZINGER, B. R., MARTUZA, R. L., GUSELLA, J. F. Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. **Nature**, v. 322, p. 664-667, 1986.

SEIZINGER, B. R., ROULEAU, G. A., OZELIUS, L. Y. **et. al.** Common pathogenetic mechanisms for three tumor types in bilateral acoustic neurofibromatosis. **Science**, v. 236, p. 317-319, 1987.

SEIZINGER, B. R., ROULEAU, G. A., LANE, A. H., FARMER, G., OZELIUS, L. J., HAINES, J. L., PARRY, D. M., KORF, F. R., PERICAK-VANCE, M. A., FARYNIARZ, A. G., HOBBS, W. J., IANNAZZI, J. A., ROY, J. C., MENON, A., BADER, J. L., SPENCE, M. A., CHAO, M. V., MULVIHILL, J. J., ROSES, A. D.,

unesp

MARTUZA, R. L., BREAKEFIELD, X. O., CONNEALLI, P. M., GUSELLA, J. F. Linkage analysis in Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17. **Genomics**, v. 1, p. 346-348, 1987a.

SEIZINGER, B. R. et al. Genetic linkage on Von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor gene. **Cell**, v. 49, p. 589-594, 1987b.

SEIZINGER, B. R. NF1: a prevalent cause of tumorigenesis in human cancers. **Nature Genetics**, v. 3, p. 97-99, 1993.

SEN, P., HITTELMAN, W. N. Kinetics and repair of bleomycin-induced chromosome damage in quiescent normal human fibroblasts and human mononuclear blood cells. **Cancer Res.**, v. 44, p. 591-596, 1984.

SETLOW, R., B., REGAN, J. D., GERMAN, J., CARRIER, W.L. Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 64, p. 1035-1041, 1969.

SHAFIK, H. M., NOKTA, M. A., AV, W. W., LEGATOR, M. S. Kinetics of cell cycle progression in Down syndrome (DS) lymphocytes. **Environ. Mutagen.**, v. 9, suppl. 8, p 98, 1987.

SHAFIK, H. M., AV, W. W., LEGATOR, M. S. Chromosomal radiosensitivity of Down syndrome lymphocytes at different stages of the cell cycle. **Hum. Genet.**, v. 78, p. 71-78, 1988.

SHAFIK, H. M., AU. W. W., WHORTON, E. B., LEGATOR, M. S. Distribution of X-ray-induced chromosome breakpoints in Down syndrome lymphocytes. **Am. J. Med. Genet**, supll. 7, p. 195-200, 1990.

SHEPHERD, K. M., SAGE, R. E. DNA binding by adriamycin, melphalan, cis-dichloro-diammineplatinum (II) and nornitrogen mustard assessed by restriction enzyme block. **Res. Comm. C. P.**, v. 54, n. 3, p. 367-378, 1986.

SHIRAISHI, I., MINOWADA, J., SANDBERG, A. A. Differential response of sister chromatid exange and chromosome aberrations to mitomycin C of normal and abnormal human lymphocytic cell lines. **Oncology,** v. 36, p. 76, 1979.

SHORT, P. M., MARTUZA, R. L., HUSON, S. M. Neurofibromatosis 2: clinical features genetic couseling and management issues, **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 414-444.

SHORVON, C. D. Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy. **Lancet**, v. 336, p. 93-96, 1990.

SIDIK, K., SMERDON, M. J. Bleomycin-induced DNA damage and repair in human cells permeabilized with lysophosphatidylcholine. **Cancer Res.**, v. 50, p. 1613-1619, 1990.

unesp

SILVERMAN, J. F., BLAHOVE, M. COLLINS, J. L., NORRIS, H. T. Cutaneous malignant melanoma in a black patient with neurofibromatosis (von Recklinghausen´s disease). **Am. J. Dermatol.**, v. 10, n. 6, p. 536-540, 1988.

SILVERMAN, J. F., BLAHOJE, M., COLLINS, J. L., MORRIS, T. Cutaneous malignant melanoma in a black patient with neurofibromatosis (von Recklinghausen´s disease). **Am. J. Dermatol.**, v. 10, n. 6, p. 536-540, 1990.

SIVALINGAM, A., AUGSBURGER, J., PERILONGO, G., ZIMMERMAN, R., BARABAS, G. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium in a patient with neurofibromatosis type 2. **J. Pediatric. Ophthalm. & Strabismus**, v. 28, n. 6, p. 320-322, 1991.

SKOLNICK, M. H., PONDER, B., SEIZINGER, B. Linkage of NF1 to 12 chromosome 17 markers: a summary of eight concurrent reports. **Genomics**, v. 1, p. 382-383, 1987.

SKUSE, G. R., KOSCIOLEK, B. A., ROWLEY, P. T. Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. **Genes, Chrom. Cancer**, v. 1, p. 36-41, 1989.

SKUSE, G. R., KOSCIOLEK, B. A., ROWLEY, P. T. The neurofibromatosis has a unicellular origin. **Am. J. Human Genet.**, v. 49, p. 600-607, 1991.

SLATER, C., HAYES, M., SAXE, N., TEMPLE-CAMP, C., BEIGHTON, P. Macromelanosomes in the iarly diagnosis of neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 8, n. 4, p. 284-289, 1986.

SLOAN, J. B., FRETZIN, D. F., BOVENMYER, D. A. Genetic counseling in segmental neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatology**., v. 22, n. 3, p. 461-467, 1990.

SMITH, S., HEYMANN, W. R. Segmental neurofibromatosis in an octogenarian. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 38, p. 807-808, 1990.

SOIDILLO, P. NELSON, L., HAJDV, S. Malignant schwannoma: clinical caracteristics, survival and response to therapy. **Cancer**, v. 47, p. 2503-2509, 1980.

SORENSEN, S. A., MULVIHILL, J. J., NIELSEN, A. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, n. 16, p. 1010-1015, 1986.

SOUZA, D. R. S. **Padrões de inativação dos cromossomos X em pacientes com quadros clínicos Klinefelterianos.** Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1984, 120p.

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.

SPIRA, M, RICCARDI, V. M., Neurofibromatosis. **Clin. Plast. Surg.**, v. 14, p. 315-325, 1987.

unesp

SPITZ, M.R., FUEGER, J.J., BED-DINGFIELD, N.A., ANNEGERS, J. F., HSU, T.C., NEWELL, G.R., SCHANTZ, S.P. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4626-4628, 1989.

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

STEPHENS, K., RICCARDI, V. M., RISING, M., NG, S., GREEN, P., COLLINS, F. S., REDIKER, K. S., POWERS, J. A., PARKER, DONIS-KELLER, H. Linkage studies with chromosome 17 DNA markers in 45 neurofibromatosis 1 families. **Genomics**, v. 1, p. 353-357, 1987.

STEPHENS, K., GREEN, P., RICCARDI, V.M., NG, S., RISING, M., BARKER, D., DARBY, J.K., FALLS, K.M., COLLINS, F.S., WILLIARD, F.H., DONNIS-KELLER, H. Genetic analysis of eight loci tightly linked to neurofibromatosis 1. **Am. J. Hum. Genet.,** v. 44, p. 13-19, 1989.

STEPHENS, K. et al. Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosome. **Hum. Genet.**, v. 88, p. 279-282, 1992.

STOTTS, J., STEINMAN, H. Congenital, segmental pigmented lesions: segmental neurofibromatosis. **Arch. Dermatol.**, v. 123, p. 252-255, 1987.

STRAUSS, S., PANSKY, M., LEWINSOHN, G. Hemorrhagic Pheochromocytoma in a pregnant patient with neurofibromatosis. **J. Ultrasound in Medicine**, v. 9, n. 3, p. 165-167, 1990.

SUSUKI, T., KUWAHARA, J., SUGIURA, Y. DNA cleavages of bleomycin transition metal complexes induced by reductant, hydrogen peroxide and ultraviolet light. **Nucleic Acids Res.**, v 15, p. 161-164, 1984.

TAALMAN, R. D. F. M., HUSTINX, T. W. J., WEEMAES, C. M. R., SEEMANOVA, E., SCHMIDT, A., PASSARGE, E., SCHERES, J. M. J. C. Further delineation of the nymegen breakage syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 32, p 425-431, 1989.

TAGUCHI, T. Enhancement of bleomycin-induced chromosome damage in a human leukemic T-cell line. **Jpn. J. Genet.**, v. 62, p. 109-117, 1987.

TAKIGUCHI, P. S., RATZ, J. L. Bilateral dermatomal neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 10, p. 451-453, 1984.

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.

unesp

TENNY, R. T. The neurosurgical management of optic glioma: results in 104 patients. **J. Neurosurg.**, v. 57, p. 452-458, 1982.

TENZEL, R. R., BOYNTON, J. R., MILLER, G. R., BUFFAM, F. V. Surgical treatment of eyelid neurofibromas. **Arch. Ophthalmol.**, v. 95, p. 593-596, 1977.

THOMAS, P. K., KING, R. H. M., CHIANG, T. R., SCARAVILLI, F., SHARMA, A. K., DOWNIE, A. W. Neurofibromatous neuropaty. **Muscle & Nerve**, v. 13, p. 93-101, 1990.

THOMPSON, M. W., Mc INNES, R. R., WILLARD, H. F. (eds). **Genetics in Medicine**, 5 ed, Philadelphia, W. B. Saunders, 1991, 499 p.

TRATTNER, A., DAVID, M., HODAK, E. **et al.** Segmental neurofibromatosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 23, p. 866-869, 1990.

TROFATTER, J. A., MAcCOLLIN, M. M., RUTTER, J. L., **et al.** A novel moesin-,ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. **Cell**, 1993; 72; 791-800.

UHLIN, S. R., POINT, H. Segmental neurofibromatosis. **Sout. Med. J.**, v. 73, n. 4, p. 526-527, 1980.

UPADHYAYA, M., SARFARAZI, M., HUSON, S. M., STEPHENS, K., BROADHEAD, W., HARPER, P. S. Chromosome 17 markers and Von Recklinghausen neurofibromatosis: a genetic linkage study in a British population. **Genomics**, v. 1, p. 358-360, 1987.

UPADHYAYA, M., SARFARAZI, M., HUSON, S. Linkage of Watson´s syndrome t xhromosome 17 markers. **J. Med. Genet.**, v. 27, p. 209, 1990.

UTSUMI, H., ELKIND, M. M. Bleomicyn-indiced potentially lethal damage and its repair. **Radiat. Res.**, v. 119, p. 534-541, 1989.

VARELLA-GARCIA, M. Teste de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) **In**: RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. L., MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese - Métodos e critérios de avaliação**. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1991, p. 123-140.

VARELLA-GARCIA, M., TAJARA, E.H. **Métodos para Análise de Cromossomos Humanos: Manual de Protocolos**: IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, 1991.

VARNHAGEN, C. K., LEWIN, DAS, J. P. Neurofibromatosis and psychological processes. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 9, p. 257-265, 1988.

VERHEST, A., HEIMANN, R., VERSCHRAEGEN, J., VAMOS, E., HECT, F. Hereditary intestinal neurofibromatosis. II. Translocation between chromosome 12 and 14. **Neurofibromatosis**, v. 1, p. 33-36, 1988.

VIJAYALAXMI, EVANS, H. J. Bleomycin-induced chromosome aberrations in Down syndrome lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 105, p. 101-113, 1982.

unesp

VISKOCHIL, D., BUCHBERG, A. M., XV, G. **et. al.** Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. **Cell**, v. 62, p. 187-192, 1990.

VISKOCHIL, D. et al. The digodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, p. 906-912, 1991.

VISKOCHIL, D., WHITE, R., CAWTHON, R. The neurofibromatosis type 1 gene. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 183-205, 1993.

VISKOCHIL, D., CAREY, J. C. Alternate and related forms of the neurofibromatoses. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 445-474.

VORECHOVSKY, I., JURASKOVA, V. Bleomycin-induced chromosomal damage in tuberous scherosis. **Jpn. J. Humna Genet**., v. 35, p. 207-213, 1990.

WADSBY, M., LINDEHAMMAR, H., EEG-OLOFSSON, O. Neurofibromatosis in childhood: neuropsychological aspects. **Neurofibromatosis**, v.2, p. 251-260, 1989.

WALLACE, M. R., MARCHUK, D. A., ANDERSEN, L. B., **et. al.** Type-1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript desrupted in three NF1 patients. **Sciense**, v. 249, p. 181-186, 1990.

WALLACE, M. R. A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. **Nature**, v. 353, p. 865-866, 1991.

WALSH, M. M., BRANDSPIGEL, K. Gastrointestinal bluding due to pancreatic schwannoma complicating von Recklingausen´s disease. **Gastroenterology**, v. 97, p. 1550-1551, 1989.

WANDER, J. V., DAS GUPTA, T. K. Neurofibromatosis. **Current Problems Surgery**, v. 14, n. 2, p. 4-76, 1977.

WASSERTEIL, V., BRUCE, S., RICCARDI, V. M. Non-von Recklinghausen´s neurofibromatosis presenting as hemifacial neurofibromas and contralateral café-au-lait spots. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 16, n. 5, 1987.

WATERLOO, J., BUZIMA, R., KELLER, W., LANE, J., TANNER, J. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutricional status of groups of children under the age of 10 years. **Bull Who**, v. 55, p. 489-498, 1977.

WEBB, T., HARDING, M. Chromosome Complement and SV40 transformation of cells from patients susceptible to malignant disease. **Br. J. Cancer**, v. 36, p. 583-591, 1977

WEGNER, R-D, METZGER, M., HANEFELD, F., JASPERS, N. G. J., BAAN, C., MAGDORF, K., KUNZE, J., SPERLING, K. A new chromosomal disorde confirmed by complementation studies. **Clin. Genet.**, v. 33, p. 20-32, 1988.

unesp

WEICHERT, K., DINE, M., CORNING, H., SILVERMAN, F. Macrocranium and neurofibromatosis. **Radiology**, v. 107, p. 163-166, 1973.

WEINBERG, R. A. Oncogeneses, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 49, p. 3713-3721, 1989.

WELEBER, R. G., ZONANA, J. Iris hamartomas (Lisch nodules) in a case of segmental neurofibromatosis. **Am. J. Ophthalmol**, v. 96, p. 740-743, 1983.

WERTELECKI, W., SUPERNAU, D., PRIVIS-SMITH, S. **et. al.** Central neurofibromatosis: a distinct entity. **Clin Res**, v. 29, p. 882A, 1981.

WHITE, R., NAKAMURA, Y., O'CONNELL, P., LEPPERT, M., LALOUEL, J. M., BARKER, D., GOLDGAR, D., SKOLNICK, M., CAREY, J., WALLIS, C. E., SLATER, C. P., MATHEW, C., PONDER, B. Tighly linked markers for the neurofibromatosis type 1 gene. **Genomics**, v.1, p. 364-367, 1987.

WHITEHOUSE, D. Diagnostic value of the café-au-lait spot in children. **Arch. Dis. Child.**, v. 41, p. 316-319, 1966.

WIENEKE, J. K., VOSIKA, J., JOHNSON, P., WANG, N., GARRY, V. F. Diferential induction of sister chromatid exchange by chemical carcinogens in lymphocytes cultured from patients with solid tumors. **Pharmacology,** v. 24, p. 67, 1982.

WIESTLER, O. D., RADNER, H. Pathology of neurofibromatosis 1 and 2. **In**: HUSON, S. M., HUGHES, R. A. eds. **The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.** Chapman & Hall medical, New York, 1994, p. 135-159.

WILLIS, S. A., LINDAHL, T. DNA ligase I deficiency in Bloom´s syndrome. **Nature**, v. 325, p. 355-357, 1987.

WINEKE, J. K., VOSIKA, J., JOHNSON, P., WANG, N., GARRY, V. F. Diferencial induction of sister chromatid exchange by chemical carcinogens in lymphocytes cultured from patients with solid tumors. **Pharmacology**, v. 24, p. 67, 1982.

WINTER, R. B., MOE, J. H., BRADFORD, D. S., LONDSTEIN, J. E., PEDRAS, C. V., WEBER, A. H. Spine deformity in neurofibromatosis. **J. Bone Joint Surg. Am**., v. 61, p. 677-694, 1979.

WOLFF, D. J., NEEDLEMAN, B. W., WASSERMAN, S. S., SCHWARTZ, S. Spontaneous and clastogen induced chromosomal breakage in scleroderma. **J. Rheumatol**, v. 18, p. 837-840, 1991.

WOLF, R. K., FRAZER, K. A., JACKER, R. K., LANSER, M. J., PITTS, L. H., COX, D. R. Analysis of chromosome 22 deletions in neurofibromatosis type 2-related tumors. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 478-485, 1992.

unesp

XU, G., LIN, B., TANAKA, K., DUNN, D., WOOD, D. 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.

YESUDIAN, P., PREMALATHA, S., THAMBIAH, A. S. Palmar melanocit macules. A sign of neurofibromatosis. **Int. J. Dermatol.**, v. 23, p. 468-471, 1984.

YOSHIDA, A., HATANAKA, S., OHI, Y., UMEKITA, Y., YOSHIDA, H. von Recklinghausen´s disease associated with somatostatin-rich duodenal carcinoid (somatostatinoma), medullary thyroid carcinoma and diffuse adrenal medullary hiperplasia. **Acta Pathol Jap.**, v. 41, n. 11, p. 847-856, 1991.

ZANELLA, F. E., BENZ-BOHM, G., STEINBRICH, W. Neurofibromatosis of the central nervous system in children: demonstration by magnetic resonance imaging. **Annales Radiologic**, v. 30, n. 7, p. 446-451, 1987.

ZEHAVI, C., ROMANO, A., GOODMAN, R. M. Iris (Lisch) nodules in neurofibromatosis. **Clin. Genet**, v. 29, p. 51-55, 1986.

ANEXO I

FUNDAÇÃO FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA DE S. J. RIO PRETO
HOSPITAL DE BASE - SERVIÇO DE GENÉTICA CLÍNICA

ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICA EM NEUROFIBROMATOSE

I. IDENTIFICAÇÃO

DATA:
NOME: RG:
NATURALIDADE: ESTADO:
DATA NASCIMENTO: SEXO: COR:
PROFISSÃO:
ENDEREÇO:
CIDADE: FONE: CEP:

II. DADOS FAMILIAIS

PAI:
DATA NASC.: COR: PROFISSÃO:
MÃE:
DATA NASC.: COR: PROFISSÃO:

III. ANTECEDENTES PESSOAIS

1. PRÉ-NATAL:

2. RN:

3. ESCOLARIDADE: DIFICULDADE:

4. COMPORTAMENTO: NORMAL ☐ NERVOSO ☐ AGRESSIVO ☐

5. DOENÇAS IMPORTANTES:

6. MEDICAMENTOS EM USO:

7. HÁBITOS: FUMAR _____ BEBER _____

IV. ANTECEDENTES FAMILIARES

1. PATOLOGIAS:

2. CONSANGÜINIDADE: _____ TIPO: _____

3. HEREDOGRAMA:

V. EXAME FÍSICO

1. IDADE DA MANIFESTAÇÃO DA NF: _____

ASSOCIAÇÃO COM GRAVIDEZ: _____

2. MCCL: PRESENTE □ AUSENTE □

LOCALIZAÇÃO:

FREQUÊNCIA: BAIXA □ MÉDIA □ ALTA □

TAMANHO:

MANCHAS HIPOPIGMENTADAS: PRESENTE □ AUSENTE □

3. SARDAS AXILARES: PRESENTE □ AUSENTE □

BILATERAIS □ UNILATERAIS □

FREQUÊNCIA: BAIXA □ MÉDIA □ ALTA □

4. NEUROFIBROMA: PRESENTE □ AUSENTE □

LOCALIZAÇÃO:

FREQUÊNCIA: BAIXA □ MÉDIA □ ALTA □

PIGMENTADO: SIM □ NÃO □

TEXTURA:

TAMANHO:

ÚNICO □ MÚLTIPLOS □

HISTOPATOLÓGICO: DATA:

OUTROS TUMORES:

5. EXAME FÍSICO DE ROTINA

ESTATURA: PESO: PC:

VI. EXAMES SOLICITADOS

1. HEMOGRAMA:

2. NA+, K+:

3. URÉIA, CREATININA:

4. GLICEMIA:

5. EEG:

6. ECG:

7. RX CRÂNIO:

RX TÓRAX:

RX COLUNA CERVICAL:

RX COLUNA TORÁCICA:

RX COLUNA LOMBAR:

RX MMSS:

RX MMII:

OUTROS:

VII. AVALIAÇÕES SOLICITADAS

1. OFTALMOLOGIA

NÓDULOS DE LISCH: PRESENTE □ AUSENTE □

BILATERAIS □ UNILATERAIS □

2. PSICOLOGIA

3. OTORRINOLARINGOLOGIA

4. OUTRAS

VIII. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

IX. ESTUDO CITOGENÉTICO