

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS E
OFTALMOLÓGICAS NA NEUROFIBROMATOSE
TIPO 2**

VANESSA WAISBERG

BELO HORIZONTE – MG

2019

ALTERAÇÕES GENÉTICAS E OFTALMOLÓGICAS NA NEUROFIBROMATOSE
TIPO 2

VANESSA WAISBERG

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Medicina Molecular

Banca Examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Débora Marques de Miranda

Co-orientador: Prof. Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues

Co-orientador: Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos, UFMG

Dr. Galton Carvalho Vasconcelos, UFMG

Dra. Juliana Garcia Carneiro, Personal

Dr. Antônio Marcos Alvim Soares Junior, PMMG

Prof. Marco Aurélio Romano Silva, UFMG (membro suplente)

BELO HORIZONTE – MG

2019

W143a Waisberg, Vanessa.
Alterações genéticas e oftalmológicas na neurofibromatose tipo 2. /
Vanessa Waisberg. -- Belo Horizonte: 2019.
65f.: il.
Orientador (a): Débora Marques de Miranda.
Coorientador (a): Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues; Márcio Bittar
Nehemy
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

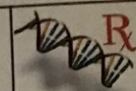
1. Hamartoma. 2. Mutação. 3. Neurofibromatose 2. 4. Membrana
Epirretiniana. 5. Retina. 6. Neuroma Acústico. 7. Tomografia de
Coerência Óptica. 8. Dissertação Acadêmica. I. Miranda, Débora
Marques de. II. Rodrigues, Luiz Oswaldo Carneiro. III. Nehemy, Márcio
Bittar. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. V. Título.

NLM: QZ 380

Bibliotecário responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



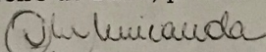
FOLHA DE APROVAÇÃO

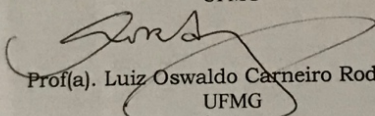
ALTERAÇÕES GENÉTICAS E OFTALMOLÓGICAS NA NEUROFIBROMATOSE TIPO 2

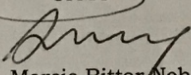
VANESSA WAISBERG

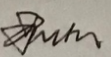
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

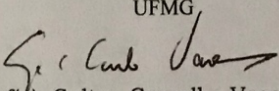
Aprovada em 01 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

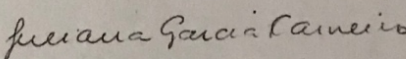

Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientador
UFMG

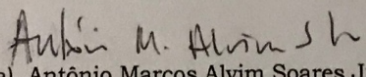

Prof(a). Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues
UFMG


Prof(a). Marcio Bittar Nehemy
UFMG


Prof(a). Daniel Vitor de Vasconcelos Santos
UFMG


Prof(a). Galton Carvalho Vasconcelos
UFMG


Prof(a). Juliana Garcia Carneiro
Clínica Personal


Prof(a). Antônio Marcos Alvim Soares Junior
PMMG

Belo Horizonte, 1 de fevereiro de 2019.

Aos pacientes com NF2, para os quais espero contribuir com mais conhecimento sobre a doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Débora Marques de Miranda pela orientação, confiança e oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Ao Professor Luiz Oswaldo Rodrigues Carneiro pelo carinho, entusiasmo e por tornar esta pesquisa possível.

Ao Professor Márcio Bittar Nehemy pelos ensinamentos e pela colaboração nos exames dos pacientes.

Ao Eric, meu amor, pelo companheirismo, incentivo e compreensão.

Ao meu pai, Yehuda, pelo apoio e pelos comentários e sugestões.

Aos meus filhos Rafael e Gabriel, que chegaram durante a pesquisa para trazer alegria e inspiração.

A minha mãe, Rosângela, pelo amor e dedicação.

A todos que estiveram presentes durante esta jornada.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Símbolos e Abreviaturas	v
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1 Estrutura da tese	8
2. Objetivos	9
3. Artigo 1	10
4. Artigo 2	16
5. Considerações finais e perspectivas futuras.....	30
6. Referências Bibliográficas.....	31
Anexo 1 - Descrição da amostra.....	35
Apêndice A	46
Apêndice B.....	47
Apêndice C	49
Apêndice D	51

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AO	Ambos os olhos
AVM	Adesão vítreomacular
BWA-MEM	Alinhador <i>Burrow Wheeler</i>
CAT	Catarata
CFNR	Camada de fibras nervosas da retina
Cm ³	Centímetros cúbicos
CMT	Espessura macular central
DR	Descolamento de retina
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
MER	Membrana epirretiniana
MLI	Membrana limitante interna
mmHg	Milímetros de mercúrio
NF1	Neurofibromatose tipo 1
NF2	Neurofibromatose tipo 2
NIR	Infra-vermelho próximo
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
RZE	Ruptura da zona elipsoide
SD-OCT	Tomografia de coerência óptica de domínio espectral
SNC	Sistema nervoso central
TMV	Volume macular total
μm	Micrometros

RESUMO

Alterações Genéticas e Oftalmológicas na Neurofibromatose Tipo 2

Introdução: Neurofibromatose tipo 2 (NF2) é uma doença autossômica dominante caracterizada por schwannomas vestibulares bilaterais, múltiplos tumores do sistema nervoso central, tumores cutâneos e catarata juvenil. A NF2 tem uma apresentação heterogênea e a gravidade da doença varia desde tumores isolados manifestados após a terceira década de vida a múltiplos tumores presentes na primeira infância. Um espectro bem definido de achados oculares tem sido especificamente associado à NF2. Existe grande variedade entre as mutações presentes no gene da NF2 causadoras da doença. Correlações fenótipo-genótipo foram observadas: as mutações tipo *nonsense* e *frameshift* estão associadas a quadros clínicos mais graves. Considerando a raridade e o potencial de associação entre os achados genéticos e oftalmológicos da NF2, o objetivo deste estudo foi descrever os achados moleculares e oftalmológicos em oito pacientes com diagnóstico clínico de NF2.

Métodos: O exame oftalmológico foi realizado em 16 olhos de pacientes com NF2. O exame incluiu medida da acuidade visual, biomicroscopia, mapeamento de retina, retinografia colorida, retinografia com infravermelho e tomografia de coerência óptica de domínio espectral. A Análise molecular foi realizada por sequenciamento de exoma completo usando o DNA extraído das células mononucleares do sangue periférico de cada indivíduo.

Resultados: Alterações oftalmológicas foram encontradas em todos os pacientes, e variaram desde alterações discretas, identificáveis somente através da OCT-SD, ao comprometimento ocular severo presente ao nascimento. Foram encontradas três categorias de mutações: mutações por interrupção prematura do códon (*nonsense*) em três pacientes, mutações tipo *frameshift* foram encontradas em dois pacientes e um paciente apresentou mutação tipo *splice site*. Três mutações novas foram identificadas.

Conclusão: Um estudo descritivo sobre as características moleculares e oculares em pacientes com NF2 é de grande valor, uma vez que existem poucas publicações sobre este assunto. Os achados clínicos e genéticos incluem três novas mutações e acrescenta novas informações sobre as características oftalmológicas e moleculares da doença. Esses dados consistem em uma série de casos que podem ser usados em estudos adicionais sobre as correlações fenótipo-genótipo na NF2.

Palavras-chave: Hamartoma, Mutação, Neurofibromatose tipo 2, membrana epirretiniana, retina, schwannoma vestibular, tomografia de coerência óptica.

ABSTRACT

Genetic and Ocular Alterations in Neurofibromatosis type 2

Background: Neurofibromatosis type 2 (NF2) is an autosomal-dominant disease, characterized by bilateral vestibular schwannomas, multiple central nervous system (CNS) tumors, skin tumors and juvenile cataract. A well-defined spectrum of ocular features has been specifically associated with NF2. NF2 has a heterogeneous presentation and the disease severity range widely; from a single tumor developed later in life to multiple tumors appearing in the first decade. NF2 disease-causing mutations includes nonsense, splice site and missense mutations. Genotype-phenotype correlations in NF2 have been proposed, with nonsense and frameshift mutations being associated with the most severe clinical presentation. Correlations between truncating mutations and ocular alterations have also been observed. The present study aims to describe ophthalmological and molecular findings in a series of eight patients with a clinical diagnosis of NF2.

Methods: Eye examination was performed in 16 NF2 eyes and it included measurement of the visual acuity, biomicroscopy, dilated fundus examination, color fundus photography, infrared photography and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). Molecular analysis was performed with whole-exome sequencing using DNA derived from peripheral blood mononuclear cells from each individual.

Results: Ophthalmological features were observed in all patients, and range widely from subtle retinal alterations identified only by SD-OCT to severe ocular involvement present at birth. Three categories of mutations were found: three patients with premature termination codon (nonsense) mutations, two patients with frameshift mutations and one patient with splice site mutation. Three novel mutations were found.

Conclusion: A descriptive study of ocular and molecular characteristics in NF2 patients is of significant value, since there are few previous reports on this subject. The clinical and genetic findings, including three novel mutations add new information on the understanding of genotype-phenotype correlations.

Keywords: Epiretinal membrane, Hamartoma, Mutation, Neurofibromatosis type 2, optical coherence tomography, retina, vestibular schwannoma

1. INTRODUÇÃO

As neurofibromatoses englobam pelo menos três doenças distintas, causadas por mutações em genes diferentes ⁽¹⁾: Neurofibromatose tipo 1, causada por mutações que inativam o gene neurofibromina no cromossomo 17q ⁽²⁾; Neurofibromatose tipo 2 (NF2), causada por mutações que inativam o gene supressor tumoral, a merlina, localizada no cromossomo 22q ^(3,4); e a Schwannomatose, causada por mutações germinativas no gene *SMARCB1* e *LZTR1*⁽⁵⁾

A neurofibromatose tipo 1 é uma doença genética que afeta cerca de 1/3.000 indivíduos. A doença é transmitida de forma autossômica dominante e caracterizada por manchas café com leite, neurofibromas cutâneos, neurofibromas plexiformes, nódulos irianos de Lisch, glioma de nervo óptico e lesões esqueléticas específicas ⁽⁵⁾ (figura 1).

A Schwannomatose é uma doença rara, descrita recentemente e caracterizada por schwannomas cutâneos múltiplos e dolorosos e tumores do sistema nervoso central sem a presença de schwannoma vestibular bilateral ⁽⁵⁾.

A NF2 é caracterizada por schwannomas vestibulares bilaterais, múltiplos tumores do sistema nervoso central (SNC), tumores cutâneos e catarata juvenil. Catarata é o único achado oftalmológico incluído nos critérios diagnóstico da doença (Tabela 1). Apesar de as alterações cutâneas na NF2 serem muito mais sutis que na NF1, aproximadamente dois terços dos pacientes apresentam lesões cutâneas pigmentadas ou tumores nodulares subcutâneos. ^(6,7) A incidência estimada está entre 1 para 33,000 nascido vivos ⁽⁸⁾ e 1 para 87,410 nascidos vivos ⁽⁹⁾ (Figura 1).

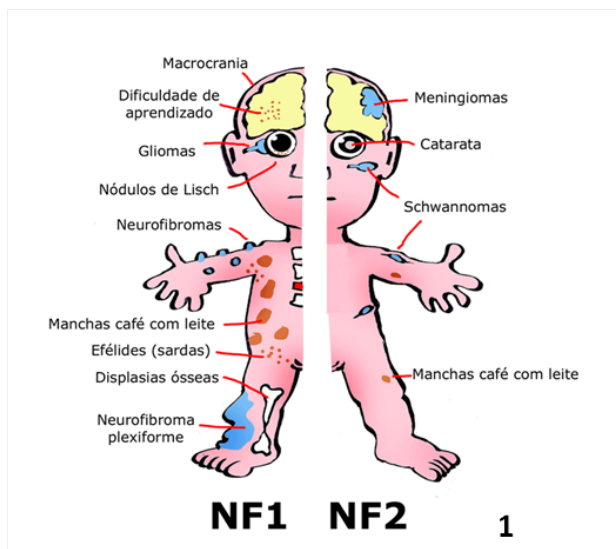


Figura 1. Ilustração mostrando as principais características da neurofibromatose tipo 1 e da neurofibromatose tipo 2. (uso autorizado por Lor).

Tabela 1. Critérios diagnósticos da Neurofibromatose Tipo 2

Achados Principais	Achados adicionais necessários para o diagnóstico
Schwannoma vestibular bilateral	Nenhum
Parente de primeiro grau com NF2	Schwannoma vestibular unilateral ou pelo menos dois dos seguintes achados: Meningiomas, schwannoma, ependimoma ou catarata juvenil
Schwannoma vestibular unilateral	Pelo menos dois dos seguintes achados: Meningiomas, schwannoma, ependimoma ou catarata juvenil
Múltiplos meningiomas	Schwannoma vestibular unilateral ou pelo menos dois dos seguintes achados: Meningiomas, schwannoma, ependimoma ou catarata juvenil

A NF2 é uma doença autossômica dominante, monogênica, causada por mutações no gene da NF2 no 22q12.2. Sua sequência inclui 95.04 kilobases abrangendo 16 exons.

Existe um exon 17 adicional, mas mutações ainda não foram descritas neste exon e seu domínio de tradução proteica não foi implicado na tumorigênese ⁽¹⁰⁾. O produto proteico do gene NF2, chamado de Merlina ou Neurofibromina 2, é uma proteína homóloga as proteínas da família ERM (ezrin/radixin/moesin), um grupo de proteínas que participa da união do citoesqueleto com a membrana plasmática ⁽¹¹⁾.

Foi sugerido que a Neurofibromina 2 apresenta atividade antitumoral, coordenando a sinalização de respostas aos fatores de crescimento tumoral. ⁽¹¹⁾. A Neurofibromina 2 é amplamente expressada nos tecidos nervosos dos vertebrados e estudos recentes mostraram que ela também é fortemente expressada nos tecidos neuroepiteliais dos olhos de vertebrados. A perda da neurofibromina 2 em camundongos levou a hiperplasia nos compartimentos neuroepiteliais oculares, replicando as anormalidades oculares encontradas em humanos com NF2 ⁽¹²⁾.

Dois fenótipos clinicamente distintos foram propostos: a) fenótipo grave, ou fenótipo de Wishart: geralmente as primeiras manifestações são por volta dos 20 anos de idade, com desenvolvimento de múltiplos tumores do SNC, além dos schwannomas vestibulares bilaterais, e apresentam rápida progressão dos tumores ^(7,13,14); b) fenótipo leve, ou fenótipo de Gardner: geralmente os pacientes são assintomáticos até a terceira década de vida, apresentam poucos tumores além do schwannoma vestibular e possuem uma evolução clínica relativamente benigna ^(7,13,15). Apesar da NF2 ser herdada de forma autossômica dominante, em cerca de metade dos pacientes afetados a doença resulta de mutações esporádicas e existe uma frequência alta de mosaicismos ^(16,17).

Assim como na gravidade da doença, existe grande variedade de mutações causadora de NF2; incluindo mutações tipo *nonsense*, mutações tipo *splice site* e mutações tipo *missense*. As mutações truncadas do tipo *nonsense* e *frameshift* são as mais comuns e geralmente estão associadas ao fenótipo mais grave da doença, independente

da sua localização no gene. Mutações tipo *missense* e grandes deleções são menos comuns, ocorrendo em aproximadamente 10% dos casos e geralmente estão associadas aos fenótipos mais leves da doença. Correlações entre mutações truncadas e alterações oftalmológicas também foram sugeridas (^{18,24,27}).

Um espectro bem definido de manifestações oculares está associado à NF2. As anormalidades oculares associadas à NF2 são catarata juvenil, geralmente com localização subcapsular posterior e /ou cortical, hamartomas do epitélio pigmentar da retina, hamartomas retinianos, membranas epirretinianas (MER), estrabismo paralítico e meningiomas da bainha do nervo óptico (^{19,20,21}). Em crianças com fenótipo grave da doença, alterações oftalmológicas como estrabismo, catarata, membrana epirretiniana e hamartoma retiniano geralmente estão presentes antes da apresentação neurológica característica. O reconhecimento de tais alterações pode ajudar a reduzir o atraso no diagnóstico dos pacientes com NF2. As alterações oftalmológicas associadas à NF2 merecem estudos adicionais sobre a prevalência, significado, relevância e impacto para a doença.

Membrana epirretiniana é uma membrana fibrocelular semitransparente e avascular localizada na superfície interna da retina, desencadeada por mudanças proliferativas na interface vitreo-retiniana. Membranas epirretinianas podem ser idiopáticas ou secundárias a uma grande variedade de desordens intraoculares. Membranas epirretinianas idiopáticas são mais comuns em pessoas acima de 50 anos.

Membranas epirretinianas vêm sendo descritas como um achado ocular associado à NF2 desde 1992 e sua incidência varia entre os autores, com relatos entre 30% e 80% (^{19,20,22,23,24}). Sisk (2010) associou as MER ao fenótipo grave da NF2 ao relatar quatro casos de crianças com MER e NF2 (²⁵). O exame padrão-ouro para diagnosticar e analisar membranas epirretinianas é a tomografia de coerência óptica de domínio espectral (SD-

OCT), introduzida em 2006. Scheffler (2008) descreveu as características tomográficas das MER em três pacientes com NF2. Esta descrição relatou MER com características únicas, descritas como membranas espessas, com várias camadas celulares e margens encaracoladas se estendendo para a interface vitreo-retiniana. Os três pacientes desta descrição eram crianças com o fenótipo grave da doença (26).

Tufos de retina são pequenas projeções da retina interna, geralmente descritos como lesões periféricas que podem aumentar o risco de descolamento de retina. A maioria dos tufos descritos são lesões císticas encontradas na periferia retiniana. Tufos de retina em paciente com NF2 foram descritos por Chan (32) em quatro olhos de 3 pacientes.

Nódulos de coroide são caracterizados por corpúsculos ovoides compostos por células de Schwann arranjadas em anéis concêntricos (33, 34) Estes nódulos geralmente não são visualizados no exame fundoscópico tradicional nem nas retinografias coloridas. A melhor forma de identificar esses nódulos é através da retinografia com infravermelho próximo (NIR). Esses nódulos geralmente são visualizados como múltiplas placas hiperrefletivas. (33,34) A relação entre nódulos de coroide e a NF1 já está bem estabelecida. Eles são tão prevalentes nos pacientes com NF1, que alguns autores sugeriram que nódulos de coroide sejam incluídos nos critérios diagnósticos da NF1 (33,34). Ao contrário da NF1, existe pouca informação sobre nódulos de coroide na NF2. Eles foram descritos em pacientes com NF2 pela primeira vez no artigo 1 desta tese.

Membranas epirretinianas associadas à NF2 podem estar diretamente relacionadas às células de Müller displásicas. As células de Muller são o principal elemento glial da retina. Elas promovem o suporte mecânico para a retina e produzem o material da membrana basal que forma a MLI. Modelos experimentais de culturas da retina neurosensorial sugerem que as células de Müller podem contribuir para o desenvolvimento de uma membrana celular em casos de ruptura da MLI (35). As células

de Müller que perderam o alelo NF2 selvagem, contendo junções aderentes anormais, podem não ser capazes de alongar e estabelecer polaridade radial, levando ao acúmulo eprirretiniano (31). As células de Müller, assim como os outros tipos de células afetados na NF2, são células gliais com características epiteliais, sugerindo que este grupo de células gliais é particularmente sensível à perda do gene NF2.

Os hamartomas associados à NF2 resultam de mutações da proteína do citoesqueleto codificada no braço longo do cromossomo 22, que age como supressor tumoral (36). Foi sugerido que as MER e os hamartomas associados a NF2 representam aspectos diferentes do mesmo processo patológico (32). É provável que os tufos de retina também estejam relacionados às células de Müller displásicas.

A Tomografia de coerência óptica é um exame de imagem não invasivo que produz cortes histológicos transversais dos tecidos oculares in vivo (figura 2). A SD-OCT é o exame padrão-ouro para analisar a interface vitreo-retiniana, alterações do tecido retiniano ou sub-retiniano (figura 2) e a medição da espessura retiniana. A tecnologia SD-OCT baseia-se na reflectometria de um feixe luminoso de baixa coerência, ao atravessar as diferentes estruturas do globo ocular. Os ecos da luz refletida dão origem às imagens com resolução de 3 a 7 μm nos aparelhos de domínio espectral. O princípio é análogo à ultrassonografia e utiliza luz infravermelha para produzir imagens da retina em 3D com alta resolução (42).

A introdução da SD-OCT na prática médica permitiu a descoberta de novas alterações oculares específicas da NF2, como tufos de retina, MER em chama de vela e microhamartomas. Ainda é pouco compreendido como as mutações no gene NF2 afetam as estruturas oculares. A descoberta destas alterações retinianas sutis e específicas e suas correlações fenótipo-genótipo podem ajudar a direcionar o monitoramento e tratamentos médicos adequados e a ajudar a entender melhor a patogênese na NF2.

O objetivo deste estudo foi descrever os achados moleculares e oftalmológicos em uma série de pacientes com diagnóstico clínico de NF2.

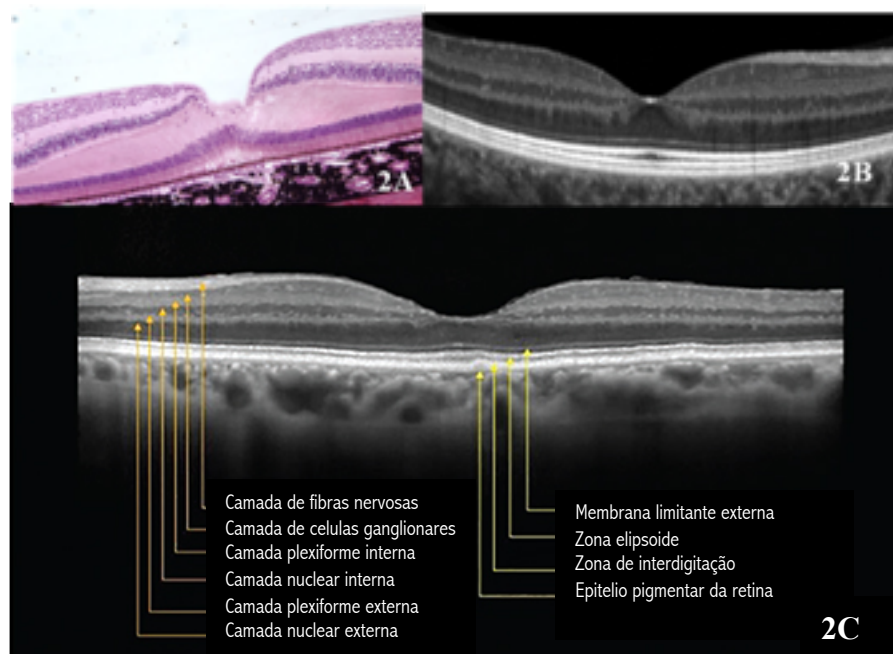


Figura 2. A) Corte histológico da retina mostrando a região foveal B) SD-OCT da região foveal. Pode-se observar notável semelhança com o corte histológico. C) Imagem de SD-OCT detalhando as camadas da retina na região foveal.

1.1 Estrutura da tese

Essa tese foi organizada em dois artigos. O primeiro artigo, intitulado *Spectral Domain Optical Coherence Tomography Findings In Neurofibromatosis Type 2*, traz um estudo detalhado sobre os achados retinianos utilizando a tomografia de coerência óptica de domínio espectral em uma série de nove pacientes com NF2. Este artigo foi redigido em inglês e publicado na revista *Investigative Ophthalmology and Visual Science* e seguiu as normas de publicação da revista.

O segundo artigo da tese, intitulado *Ocular Alterations, Molecular Findings and Three Novel Pathological Mutations In a Series of NF2 Patients*, traz um estudo sobre os resultados dos exames genéticos e uma descrição abrangente sobre as alterações oftalmológicas em uma série de oito pacientes com NF2. Este artigo foi redigido em inglês e foi publicado na revista *Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology* e seguiu as normas de publicação da revista.

Os objetivos do estudo serão descritos antes da apresentação dos artigos. Após a apresentação dos artigos serão discutidas as considerações finais e perspectivas futuras sobre o tema. Uma descrição detalhada sobre a amostra será apresentada nos anexos. O parecer com a aprovação do comitê de ética e os termos de consentimento utilizados na pesquisa serão apresentados nos apêndices.

2. OBJETIVOS

2.1. O objetivo principal:

Estabelecer as alterações genéticas e moleculares nos pacientes com NF2.

2.2. Objetivos secundários:

- Determinar a correlação entre os achados moleculares e os achados oftalmológicos.
- Determinar as anormalidades retinianas e coroidianas relacionadas com a NF2 através da SD-OCT.

3. ARTIGO 1

Special Issue

Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Findings in Neurofibromatosis Type 2

Vanessa Waisberg,¹ Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues,² Márcio Bittar Nehemy,¹ Maria Frasson,¹ and Débora Marques de Miranda³

¹Department of Ophthalmology, Clinical Hospital of Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brazil

²Department of Clinical Medicine and Neurofibromatosis Reference Center, Clinical Hospital of Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brazil

³Department of Pediatrics and INCT Molecular Medicine, Clinical Hospital of Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brazil

Correspondence: Vanessa Waisberg, Avenida Brasil, 691/401, Belo Horizonte, MG, 30140-000, Brazil; vanessawaisberg@hotmail.com.

Submitted: December 14, 2015
Accepted: May 14, 2016

Citation: Waisberg V, Rodrigues LOC, Nehemy MB, Frasson M, de Miranda DM. Spectral-domain optical coherence tomography findings in neurofibromatosis type 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:OCT262–OCT267. DOI:10.1167/iovs.15-18919

PURPOSE. Neurofibromatosis type 2 (NF2) is an autosomal-dominant disease, characterized by bilateral vestibular schwannomas, multiple central nervous system (CNS) tumors, skin tumors, and juvenile cataract. The present study assessed retinal abnormalities using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) in a case series of NF2 patients.

METHODS. Nine NF2 patients from the neurofibromatosis outpatient reference center of the Federal University of Minas Gerais, in Brazil, were submitted to a complete anamnesis and a detailed ophthalmic evaluation, including SD-OCT, to detect retinal lesions.

RESULTS. Of the nine NF2 patients evaluated, five had an early onset (<20 years) of NF2, and four patients had a late onset (>20 years) of symptoms. SD-OCT scans revealed retinal abnormalities in every patient with early onset (EOS) and in two patients with late onset (LOS) of the disease. In the EOS group, SD-OCT scans revealed flame-shaped epiretinal membranes (ERM) with peculiar characteristics in four eyes of three patients. Two patients had fine undulations of the inner retinal surface with a subtle ERM. Retinal hamartomas were present in four eyes of three patients with EOS; in two eyes, they were subclinical and were detected only by SD-OCT scans. In two patients with LOS and one patient with EOS, SD-OCT scans revealed retinal tufts of a nerve fiber layer.

CONCLUSIONS. SD-OCT revealed ERM in most patients with NF2, therefore it may be a valuable exam for evaluating NF2 patients. Epiretinal membranes in NF2 has unique features, distinguishing it from idiopathic ERM or membranes associated with other diseases. We suggest that flame-shaped ERM seems to be specific for NF2 and that ERM can be considered as an important diagnostic sign of NF2.

Keywords: neurofibromatosis type 2, optical coherence tomography, retina, vestibular schwannoma, epiretinal membrane

Neurofibromatosis comprises at least three distinct disorders caused by mutations in different genes¹ as follows: neurofibromatosis 1 (NF1) is caused by mutations that inactivate the neurofibromin gene on chromosome 17q²; neurofibromatosis 2 (NF2) is caused by inactivating mutations of the merlin gene on chromosome 22q^{3,4}; and Schwannomatosis, is caused by germline mutations in the *SMARCB1* (or *INI1*) gene.⁵

Neurofibromatosis 2 is an autosomal-dominant disease, which is characterized by bilateral vestibular schwannomas, multiple central nervous system (CNS) tumors, skin tumors, and juvenile cataract.^{6,7} Its estimated incidence lies between 1 in 33,000⁸ live births and 1 in 87,410 live births.⁹

The following two clinical subtypes have been proposed: (1) the severe subtype, or Wishart subtype, which usually presents an age onset at approximately 20 and are seen to enhance CNS tumors formations in addition to bilateral vestibular schwannoma, exhibiting rapid clinical progression,^{7,10,11} and (2) the mild subtype, or Gardner subtype, which often lacks symptoms within the third decade of the patient's life, and presents with

few tumors other than vestibular schwannoma, which has a relatively benign clinical course.^{7,10,12} Although NF2 is inherited in an autosomal-dominant manner, approximately half of the cases in affected individuals are caused by sporadic mutation, and there is a high rate of mosaicism.^{13,14}

A well-defined spectrum of ocular features is associated with NF2. Ocular abnormalities associated with NF2 are posterior subcapsular/capsular or cortical lenticular opacities, RPE hamartomas, retinal hamartomas, epiretinal membranes (ERM), paralytic strabismus, and optic nerve sheath meningiomas.^{15–17}

Optical coherence tomography (OCT) is a noninvasive diagnostic technique that renders an in vivo cross-sectional view of the retina. SD-OCT technology uses infrared light to produce images of the retina with very high resolution (<7 μm).

Optical coherence tomography and near-infrared reflectance (NIR) have been shown to be valuable tools to evaluate NF1 patients. Choroidal nodules detected by NIR and SD-OCT have high specificity as diagnostic indicators of NF1.^{18,19}



TABLE 1. Patient Demographics

Patient N°	Sex	Symptom Duration, y	Age at Last Visit, y	Delay in Diagnosis, y
1	M	3	50	0
2	F	3	33	0
3*	M	20	28	8
4*	M	17	19	15
5*	M	8	14	3
6	F	12	37	12
7*	F	16	32	1
8*	F	6	24	1
9	F	21	48	14

* Patients with early onset.

Evaluation of peripapillary RNFL thickness has been proposed as a noninvasive testing method to detect early signs of optic pathway gliomas in children with NF1.^{20,21} There is little information about OCT in NF2, probably because NF2 is much rarer than NF1. There should be more studies on the prevalence, significance, relevance, and impact of ophthalmologic findings on NF2. Epiretinal membranes is a semitranslucent, avascular, fibrocellular membrane on the inner retinal surface that is caused by proliferating changes at the vitreoretinal interface. Epiretinal membranes can be idiopathic or secondary to a wide variety of intraocular conditions. Idiopathic ERM is most common in patients over the age of fifty. Epiretinal membranes have been described as an NF2 ocular finding since 1992, and its incidence varies among authors from 30% to 80%.^{15,16,22-24} Sisk²⁵ associated ERM with a severe phenotype of NF2. The gold standard exam for diagnosing and analyzing ERM is SD-OCT. Scheffer²⁶ described OCT characteristics of ERM in three patients with NF2. This description reported an ERM with unique features, which were described as several cell layers thick with curled edges stretching into the vitreoretinal interface. Considering that SD-OCT is a noninvasive and easily performed exam, the present study aims to evaluate retinal abnormalities using SD-OCT in a group of NF2 patients to characterize the frequency and relevance of ERM for NF2.

METHODS

Patients

Between February 2014 and June 2015, we evaluated nine patients with NF2. Patients were clinically examined in a neurofibromatosis outpatient reference center of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. The NF2 diagnosis was confirmed by neuroimaging. None of the nine NF2 patients were parentally related. Nine age- and sex-matching controls with no history of neurologic or ophthalmologic disorders were included.

Eye examination was performed in 18 NF2 eyes, and it included measurement of the visual acuity and biomicroscopy before and after pupillary dilatation, with special attention to the presence of iris hamartomas and lens opacities, dilated fundus examination, color fundus photography, infrared photography, fundus autofluorescence, and SD-OCT. SD-OCT was accomplished in 17 NF2 eyes; in one eye, OCT scans were not performed, due to a dense subcapsular lens opacity. Optical coherence tomography examinations were performed by means of Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Eye Explorer Version 1.9.10.0 - Acquisition Software Version: 6.0.11.0;

Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Acquisition protocols included at least one cross-hair scan, a 20° × 15° 19 B-scans macular cube, a 20° × 15° 19 B-scans macular cube with enhanced-depth imaging (EDI) and mode with additional horizontal and vertical single lines or cube, to cover any lesion detected by clinical examination or fundus photography.

The study was approved by the ethics committee of the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais and followed the principles of the Declaration of Helsinki.

OCT Image Analysis

Two trained ophthalmologists independently analyzed the images for qualitative OCT variables, and quantitative measurements of anatomical features and a senior masked investigator provided arbitration in cases of disagreement.

The images were evaluated for the presence of ERM, type of ERM, presence of vitreous macular adhesion (VMA), foveal deformation, retinal folds or undulations, internal limiting membrane (ILM) disruption, ellipsoid zone disruption (EZZ), central macular thickness (CMT), and retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness. The inner circle of 1-mm radius of Early Treatment Diabetic Retinopathy Study map was defined as CMT.

RESULTS

Demographics

Demographic data are shown in Table 1. The overall delay between the onset of symptoms and diagnosis of NF2 averaged 6.7 years. Of the nine patients, five had an early onset (EOS) of NF2 (<20 years), and the delay between the first symptoms and diagnosis in this group was an average of 7.8 years (range, 1-18 years; Table 1). The initial symptoms of these five patients were unspecific symptoms, such as convulsion, strabismus, chest pain, inferior limb paresis, and café au lait spots. Late onset (LOS) of NF2 (>20 years) was observed in four of nine patients, and the delay between the first symptoms and diagnosis averaged 5.5 years (range, 0-14 years). The initial symptoms of these four patients were also unspecific, including inferior limbs paresis, facial palsy, facial pain, and cervical pain.

Specific NF2 Ocular Findings

Neurofibromatosis 2-specific ocular findings were observed in eight of nine patients, all five patients in the EOS group, and three in the LOS group. Cataracts were noted in five of nine patients (3 with EOS and 2 with LOS). Cataracts were visually impacting four eyes of three patients. One patient in the EOS group had chronic-appearing retinal detachment and retinal hamartoma in the right eye. Epiretinal membranes were noted in all five patients in the EOS group; three patients had thick ERM with peculiar characteristics on SD-OCT scans, and two patients had subtle ERM with fine undulations on the inner retinal surface. Retinal hamartomas were noted in four eyes of three patients in the EOS group. In both eyes of patient seven retinal hamartomas were subclinical, detected only by SD-OCT. All patients with epiretinal membrane and retinal hamartoma were in the early onset group. Two patients with LOS had subtle retinal abnormalities that were detected exclusively by SD-OCT; these abnormalities were small elevations of RNFL that were compatible with RNFL tufts. Strabismus was noted in two patients in the EOS group. Patients with an early onset had more NF2-specific ocular findings (Table 2).

TABLE 2. Incidence of Ocular Specific Findings in Patients With Neurofibromatosis Type 2

Ocular Finding	All 9 Patients			Early Onset (n = 5)			Late Onset (n = 4)		
	Eyes	Patients	% of n = 9	Eyes	Patients	% of n = 5	Eyes	Patients	% of n = 4
Cataract	8	5	55.5	6	3	60	2	2	50
ERM	7	5	55.5	7	5	100	0	0	0
Hamartoma	4	3	33.3	4	3	60	0	0	0
Strabismus	2	2	22.2	2	2	40	0	0	0

Other Ophthalmologic Findings

Nonspecific ophthalmologic findings were detected in four patients. Exposure keratopathy was found in three patients (2 with EOS and 1 with LOS), caruncula nevus in one patient in the LOS group, optic disc edema in three eyes of two patients in the EOS group, and optic nerve atrophy in one eye of a patient in the EOS group.

Optical Coherence Tomography

Quantitative Analysis. The mean central macular thickness (CMT) was $269 \pm 35 \mu\text{m}$ in control eyes and $311 \pm 83 \mu\text{m}$ in all NF2 eyes. In the EOS eyes, CMT was $352 \pm 101 \mu\text{m}$; in the LOS eyes, CMT was $268 \pm 17 \mu\text{m}$. The total macular volume (TMV) was $8.79 \pm 0.18 \text{ mm}^3$ in control eyes and $8.66 \pm 0.78 \text{ mm}^3$ in all NF2 eyes. In the EOS eyes, the TMV was $8.68 \pm 1.12 \text{ mm}^3$; in the LOS eyes, the TMV was $8.64 \pm 0.24 \text{ mm}^3$. The SD shows great variability in the thickness and volume measurements in the EOS eyes (Table 3). The mean peripapillary RNFL thickness in EOS patients was $153 \pm 104 \mu\text{m}$ in the superior sector, $97 \pm 77 \mu\text{m}$ in the nasal sector, $170 \pm 125 \mu\text{m}$ in the inferior sector and $64 \pm 18 \mu\text{m}$ in the temporal sector. In LOS patients the mean peripapillary RNFL thickness was $144 \pm 14 \mu\text{m}$ in the superior sector, $70 \pm 13 \mu\text{m}$ in the nasal sector, $139 \pm 12 \mu\text{m}$ in the inferior sector and $75 \pm 8 \mu\text{m}$ in the temporal sector. The great variability in peripapillary thickness observed in EOS group was related to optic nerve atrophy in one eye and optic disc edema in tree eyes.

Qualitative Analysis. SD-OCT scans revealed retinal abnormalities in all patients with EOS and in two patients

with LOS. A thick and dense ERM at the macula, with a flame-shaped appearance extending into the vitreous, was observed in four eyes of three patients with EOS (Fig. 1). In three eyes with a flame-shaped ERM, there was loss of foveal contour. These ERMs were not visually significant, despite the marked retinal thickening and foveal deformation. Undulations of the inner retinal surface with a subtle ERM were observed in three eyes of two patients with EOS (Fig. 2). In two eyes of two patients with LOS and one eye of a patient with EOS, SD-OCT scans revealed small focal elevations at the retina surface (Fig. 3). Choroidal abnormalities were detected in two eyes of two patients with EOS. One eye presented with a palcoid choroidal nodule and the other eye presented with a localized reduction in choroidal thickness at the perifoveal region. Qualitative abnormalities were not observed in control subjects.

The SD-OCT of four retinal hamartomas in four eyes revealed tumors with different aspects. In both eyes of a patient, tumors had a highly internally reflective and translucent mass with clear delineation of the external retinal layers and RPE. These endophytic tumors seem to be confined to the RNFL and ganglion cell layer (Figs. 4A, 4B). Two hamartomas in another two patients were associated with ERM on their surface and displayed retinal disorganization of multiple layers with disruption of the ellipsoid zone (Figs. 4C, 4D). At the macula, the ellipsoid zone was preserved in all eyes, the VMA was present in all eyes, and no eyes presented cystoid macular edema (Table 3). It is interesting to note that most of the findings were present in only one eye from each patient; with the exceptions of patients 7 and 8. The first of these patients presented bilateral subclinical retinal hamartomas and subtle ERM with undulations of the inner retinal surface and the

TABLE 3. Spectral-Domain Optical Coherence Tomography: Features in Neurofibromatosis Type 2 Eyes

Patients	CMT	TMV	Flame-Shaped ERM	Subtle ERM	RNFL Elevation	Retinal Hamartoma	EZD	VMA
1-OD	253 μm	8.57 mm^3	–	–	–	–	–	+
1-OS	251 μm	8.75 mm^3	–	–	–	–	–	+
2-OD	261 μm	8.32 mm^3	–	–	+	–	–	+
2-OS	249 μm	8.33 mm^3	–	–	–	–	–	+
3-OD	RD	RD	RD	RD	RD	+	RD	RD
3-OS	267 μm	7.97 mm^3	–	+	–	–	–	+
4-OD	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT
4-OS	555 μm	9.79 mm^3	+	–	–	–	–	+
5-OD	443 μm	9.59 mm^3	+	–	+	–	–	+
5-OS	332 μm	9.19 mm^3	–	–	–	–	–	+
6-OD	286 μm	8.91 mm^3	–	–	–	–	–	+
6-OS	284 μm	8.95 mm^3	–	–	–	–	–	+
7-OD	283 μm	6.35 mm^3	–	+	–	+	–	+
7-OS	320 μm	8.75 mm^3	–	+	–	+	–	+
8-OD	364 μm	9.44 mm^3	+	–	–	–	–	+
8-OS	257 μm	8.41 mm^3	+	–	–	+	+	+
9-OD	291 μm	8.77 mm^3	–	–	–	–	–	+
9-OS	275 μm	8.53 mm^3	–	–	–	–	–	+

VMA, vitreomacular adhesion; CME, cystoid macula edema; RD, retinal detachment; CAT, cataract.

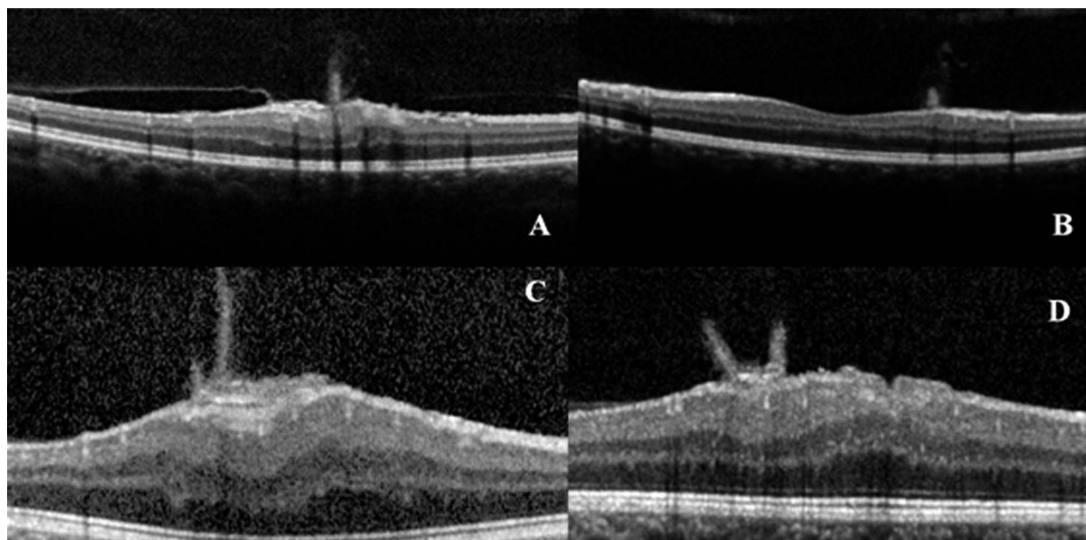


FIGURE 1. (A) SD-OCT of the right eye of patient 8 showing an ERM with flame-shaped appearance extending to the vitreous. There is mild disorganization of the internal retinal layers and vitreous partial detachment with VMA. (B) SD-OCT of the left eye showing a flame-shaped ERM with preservation of the retinal contour and microarchitecture. (C) SD-OCT of the left eye of case 4 showing a several-layer ERM extending into the vitreous and evident retinal thickening with preservation of the ellipsoid zone. (D) SD-OCT demonstrating a thick ERM with a flame shape appearance extending into the vitreous, which is similar to case 4. There are folds on the retina surface and marked retinal thickening. The ellipsoid zone is preserved.

second patient was observed to have bilateral flame-shaped ERM.

DISCUSSION

Neurofibromatosis 2 is a rare disease with a lifelong potential for unpredictable tumor growth. Early diagnosis and comprehensive follow-up are challenging. Most of the ophthalmic findings in NF2 are probably congenital, but they may become symptomatic over time.^{15,27} Ocular NF2-specific findings usually appear before neurological symptoms and hearing loss; therefore, they are extremely useful in early diagnosis, allowing for better planning of therapy in young patients with NF2.²⁷⁻²⁹

SD-OCT scans revealed retinal abnormalities in seven of nine patients with NF2. All patients with retinal abnormalities on SD-OCT had bilateral vestibular schwannomas. It is possible that the two patients with unilateral vestibular schwannoma and without retina abnormalities were mosaics, which occurs in approximately 25% of NF2 patients.^{13,14} Increase in CMT found in EOS group was probably due to traction effects of the ERM in three patients. One patient with EOS presented a perifoveal hamartoma that caused foveal deformation and

increased in CMT in both eyes. Common features among our patients included flame-shaped ERM, retinal undulations with a subtle ERM, focal elevations of RNFL, and retinal hamartomas. Two of our patient's lesions were subclinical retinal hamartomas that were only detected by SD-OCT scans. The flame-shaped appearance on OCT scans of ERM in four eyes of three patients with an early onset of NF2 were sufficiently distinct, allowing the establishment of a pattern. Scheffer et al.²⁶ described the OCT characteristics of a peculiar ERM in three NF2 patients with a severe phenotype. In one of the cases described, the unique OCT findings were the sole reasons the diagnosis of NF2 was established.

McLaughlin et al.³⁰ described ocular histopathologic findings in a 32-year-old woman who died from NF2 complications. They found a thin ERM in the right eye consisting of spindle and cuboidal cells, consistent with a glial origin. In the left eye, they found a thick ERM consisting of cords that are predominantly cuboidal cells, which are consistent with Müller cells and an astrocyte origin. Han et al.³¹ described the histologic features of an ERM that was surgically removed in a 2-year-old child. They found a highly cellular membrane with up to four layers of cells of indeterminate origin and speculated

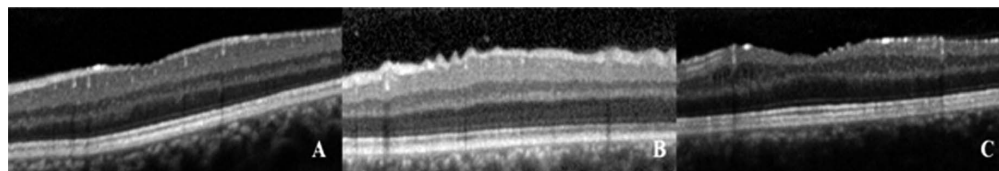


FIGURE 2. (A) SD-OCT of the left eye of patient 3 showing fine undulations on the retinal surface, with preservation of the retinal microarchitecture and with a subtle ERM. (B) SD-OCT of the left eye of patient 7 showing speculated undulations of the retina surface without an evident ERM. The ellipsoid zone is preserved. (C) SD-OCT of the right eye of patient 7 showing fine undulations of the retinal surface, similar to patient 3.

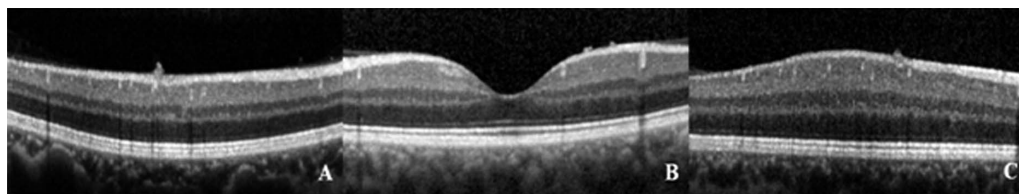


FIGURE 3. (A) SD-OCT of case 2 showing disruption of ILM with a focal elevation of RNFL and preservation of retinal microarchitecture. (B) SD-OCT of case 1 showing small focal elevations at the left eye fovea. The foveal contour and ellipsoid zone are preserved. (C) SD-OCT of case 5 showing a small focal elevation of RNFL similar to cases 2 and 1.

that the NF2 ERM is hamartomatous in origin. Chan et al.³² described the histopathologic and immunohistochemistry findings of seven NF2 eyes, and they found ERM and retinal hamartomas in all eyes. They also found retinal tufts arising from RNFL in four eyes of three patients. Some of our patient's images show remarkable similarity to the RNFL tufts found in histopathologic sections of NF2 eyes that were previously described by Chan. To the best of our knowledge, this is the first description of SD-OCT features of such lesions.

Epiretinal membranes associated with NF2 may be directly related to dysplastic Müller cells. Müller cells are the predominant glial element of the retina. They provide the mechanical support to the retina and produce the basement membrane material that forms the ILM. Experimental models of cultured sensory retina suggest that Müller cells might contribute to the development of a cellular membrane in case of ILM disruption.³⁵ Owing to the abnormal adherens junctions, Müller cells that have lost their wild-type NF2 allele may not be able to elongate and establish radial polarity, leading to epiretinal accumulation.³¹ Müller cells, like the other main cell types affected in NF2, are glial cells with epithelial features, suggesting that this subset of glial cells is particularly sensitive to NF2 loss. Neurofibromatosis 2 hamartomas result

from mutations in the cytoskeletal protein encoded in the long arm of chromosome 22, which functions as a tumor suppressor.³⁴ It has been suggested that NF2-ERM and retinal hamartomas represent different aspects of the same pathological process.³² It is possible that the retinal tufts and undulations of the retinal surface found in some of our patients are also related to dysplastic Müller cells.

In conclusion, our study showed that SD-OCT depicted retina and vitreous alterations in most patients with NF2, and it is a valuable tool for evaluating these patients. Epiretinal membranes and subclinical hamartomas that are evident on SD-OCT can be difficult to identify with the fundus exam. Epiretinal membrane in NF2 has unique features that distinguish it from idiopathic ERM or membranes associated with other diseases. Therefore, the detection of this peculiar ERM in a young patient is very suggestive of NF2. The NF2 diagnostic criteria may be absent at the initial clinical presentation in children, and it is probably the main reason for the delayed diagnosis in the NF2 EOS group. Although this paper reports a small number of patients flame-shaped ERM appears to be specific for NF2, and its inclusion in the classical diagnostic criteria could be very useful.

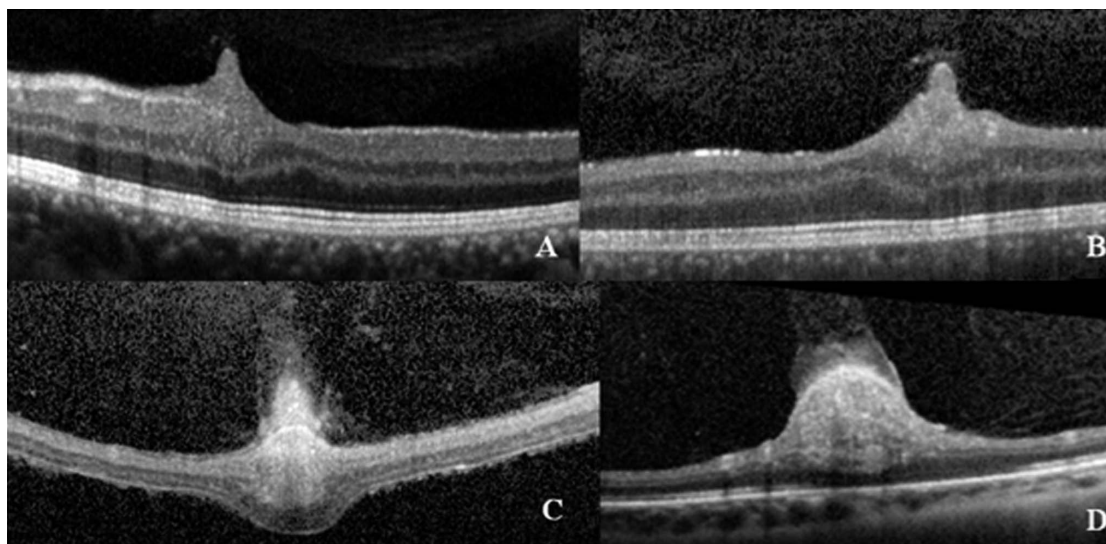


FIGURE 4. (A) SD-OCT of the left eye of patient 7, showing a retinal hamartoma involving the RNFL and ganglion layer. External layers and ellipsoid zone are preserved. (B) SD-OCT of the right eye of patient 7 showing a retinal hamartoma that is similar to the one in the fellow eye. (C) SD-OCT of a retinal hamartoma with an ERM associated with a detached retina of patient 3. (D) SD-OCT of the left eye of patient 8, showing a retinal hamartoma with disorganization of the internal and external retinal layers, which is associated with ERM and disruption of the ellipsoid zone.

Acknowledgments

Supported by Federal University of Minas Gerais - Brazil (Belo Horizonte, MG, Brazil) and INCT de Medicina Molecular, CNPq/FAPEMIG/CAPES (Belo Horizonte, MG, Brazil).

Disclosure: **V. Waisberg**, None; **L.O.C. Rodrigues**, None; **M.B. Nehemy**, None; **M. Frasson**, None; **D. M. de Miranda**, None

References

1. NIH conference statement. Neurofibromatosis 1 (von Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *Ann Intern Med.* 1990;113:39-52.
2. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, et al. Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell.* 1987;49:589-594.
3. Roleau G, Seizinger BR, Ozelius LG, et al. Genetic linkage analysis of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature.* 1987;329:246-248.
4. Cooper J, Giancotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett.* 2014;16:2743-2752.
5. Rodrigues LO, Batista PB, Goloni-Bertollo EM, et al. Neurofibromatosis part 1 - diagnosis and differential diagnosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72:241-250.
6. Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:16.
7. Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med.* 1992;84:603-618.
8. Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet.* 2010;152A:327-332.
9. Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J. Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology.* 2000;54:71-76.
10. Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI, et al. Neurofibromatosis 2 (NF): clinical characteristics of 63 affected individual and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1994;52:450-461.
11. Eldridge R, Parry DM, Kaiser-Kupfer MI. Neurofibromatosis 2: clinical heterogeneity and natural history in 39 individual in 9 families and 16 sporadic cases. *Am J Hum Genet Suppl.* 1991;49:A676.
12. Gardner WJ, Frazier CH. Bilateral acoustic neurofibromatosis: a clinical study and field survey of a family of five generations with bilateral deafness in thirty-eight members. *Arch Neurol Psychiatry.* 1930;23:266-302.
13. Kluwe L, Mautner V, Heinrich B, et al. Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet.* 2003;40:109-114.
14. Kluwe L, Mautner VF. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. *Hum Mol Genet.* 1998;7:2051-2055.
15. Kaye LD, Rothner AD, Beauchamp GR, Meyers SM, Estes ML. Ocular findings associated with neurofibromatosis type II. *Ophthalmology.* 1992;99:1424-1429.
16. Bosch MM, Boltshauser E, Harpes P, Landau K. Ophthalmologic findings and a long-term course in patients with neurofibromatosis type 2. *Am J Ophthalmol.* 2006;141:1068-1077.
17. Feucht M, Griffiths B, Niemüller I, Haase W, Richard G, Mautner VF. Neurofibromatosis 2 leads to higher incidence of strabismic and neuro-ophthalmological disorders. *Acta Ophthalmol.* 2008;86:882-886.
18. Viola F, Villani E, Natacci F, et al. Choroidal abnormalities detected by near-infrared reflectance imaging as a new diagnostic criterion for neurofibromatosis 1. *Ophthalmology.* 2012;119:369-375.
19. Abdolrahimzadeh S, Felli L, Plateroti R, et al. Morphologic and vasculature features of the choroid and associated choroidal thickness alterations in neurofibromatosis type 1. *Br J Ophthalmol.* 2015;99:789-793.
20. Chang L, El-Dairi MA, Frempong TA, et al. Optical coherence tomography in the evaluation of neurofibromatosis type 1 subjects with optic pathway gliomas. *J AAPOS.* 2010;14:511-517.
21. Topcu-Yilmaz P, Kasim B, Kiratli H. Investigation of retinal nerve fiber layer thickness in patients with neurofibromatosis 1. *Jpn J Ophthalmol.* 2014;88:172-176.
22. Landau K, Yasargil GM. Ocular fundus in neurofibromatosis type 2. *Br J Ophthalmol.* 1993;77:646-649.
23. Meyers SM, Gutman FA, Kaye LD, Rothner AD. Retinal changes associated with neurofibromatosis 2. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1995;93:245-257.
24. Feucht M, Kluwe L, Mautner VF, Richard G. Correlation of nonsense and frameshift mutations with severity of retinal abnormalities in neurofibromatosis 2. *Arch Ophthalmol.* 2008;126:1376-1380.
25. Sisk RA, Berrocal AM, Scheffler AC, Dubovy SR, Bauer MS. Epirretinal membranes indicate a severe phenotype of neurofibromatosis type 2. *Retina.* 2010;30:51-58.
26. Scheffler AC, Dubovy SR, Berrocal AM. Optical coherence tomography characteristics of epiretinal membranes in neurofibromatosis 2. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2008;39:73-77.
27. Parry DM, MacCollin MM, Kaiser-Kupfer MI, et al. Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 1996;59:529-539.
28. Evans DGR, Birch JM, Ramsden RT. Paediatric presentation of type 2 neurofibromatosis. *Arch Dis Child.* 1999;81:496-499.
29. Parry A, Giannini C, Raghavan R, et al. Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuro-pathol Exp Neurol.* 2001;60:994-1003.
30. McLaughlin ME, Pepin SM, MacCollin MM, Choopong P, Lessell S. Ocular pathologic findings of neurofibromatosis type 2. *Arch Ophthalmol.* 2007;125:389-394.
31. Han DP, Chin M, Simons KB, Albert DM. Surgical removal of an atypical macular epiretinal membrane in neurofibromatosis type 2: clinicopathologic correlation and visual outcome. *Arch Ophthalmol.* 2012;130:1337-1339.
32. Chan C, Koch CA, Kaiser-Kupfer MI, et al. Loss of heterozygosity for the NF gene in retinal and optic nerve lesions of patients with neurofibromatosis 2. *J Pathol.* 2002;198:14-20.
33. Song BJ, Ko MK, Choe JK. Ultrastructural change of the Müller cell in the culture of sensory retina. *Korean J Ophthalmol.* 1995;9:84-88.
34. Schachat AP, Shields JA, Fine SL, et al. Combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmology.* 1984;91:1609-1615.

4. ARTIGO 2

Author's personal copy

Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology
<https://doi.org/10.1007/s00417-019-04348-5>

GENETICS



Ocular alterations, molecular findings, and three novel pathological mutations in a series of NF2 patients

Vanessa Waisberg¹ · Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues² · Márcio Bittar Nehemy¹ · Luciana Bastos-Rodrigues³ · Débora Marques de Miranda⁴

Received: 22 November 2018 / Revised: 18 March 2019 / Accepted: 1 May 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose To evaluate ophthalmological and molecular findings in eight patients with a clinical diagnosis of neurofibromatosis type 2 (NF2). New pathological mutations are described and variability in the ophthalmic phenotype and NF2 allelic heterogeneity are discussed.

Methods Eye examination was performed in eight NF2 patients, and it included the measurement of the visual acuity, biomicroscopy, dilated fundus examination, color fundus photography, infrared photography, and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). Molecular analysis was performed with whole-exome sequencing using DNA derived from peripheral blood mononuclear cells from each individual.

Results Ophthalmological features were present in all patients, ranging from subtle retinal alterations identified only using SD-OCT to severe ocular damage present at birth. Six mutations were observed: two patients with stop codon mutation as shown on table 1 and result section, three patients with frameshift mutation as shown on table 1 and result section. Three novel mutations were found among them.

Conclusions It is a descriptive study of a rare disease, with poor previous literature. Clinical and genetic data are shown, reviving the need to further studies to clarify the genotype-phenotype correlations in NF2.

Keywords Hamartoma · Mutation · Neurofibromatosis type 2 · Optical coherence tomography · Retina · Vestibular schwannoma

Introduction

Neurofibromatosis is a group of three genetic conditions caused by mutations in different genes [1] as follows: neurofibromatosis 1 (NF1) is caused by mutations that inactivate the neurofibromin gene on chromosome 17q [2]; neurofibromatosis 2 (NF2) is

caused by inactivating mutations of the NF2 gene on chromosome 22q [3, 4]; and schwannomatosis is caused by germline mutations in SMARCB1 and LZTR1 genes [5].

Neurofibromatosis type 2 (NF2) is characterized by bilateral vestibular schwannomas, multiple central and peripheral nervous system tumors, and ocular manifestations [6]. Its estimated incidence lies between 1 in 33,000 [7] live births and 1 in 87,410 live births [8]. NF2 has a heterogeneous presentation and the disease severity ranges widely, from a single tumor developed later in life to multiple tumors developed in the first decade. There is also a diverse landscape of disease-causing NF2 mutations, including nonsense mutations, splice site mutations, and missense mutations [9]. Genotype-phenotype correlations in NF2 have been proposed, with nonsense and frameshift mutations being associated with the most severe clinical picture. Correlations between truncating mutations and ocular findings have also been observed [10, 11].

Neurofibromatosis type 2 (NF2) is a monogenic autosomal dominant disease, caused by mutations on 22a12.2 of NF2 gene. The NF2 gene is a tumor suppressor gene that has 17

✉ Vanessa Waisberg
vanessawaisberg@hotmail.com

¹ Department of Ophthalmology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Department of Clinical Medicine and Neurofibromatosis Reference Center, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Department of Nutrition, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Department of Pediatrics and Molecular Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Ocular Alterations, molecular findings, and three novel pathological mutations in a series of NF2 patients

Introduction:

Neurofibromatosis is a group of three genetic conditions caused by mutations in different genes ¹ as follows: neurofibromatosis 1 (NF1) is caused by mutations that inactivate the neurofibromin gene on chromosome 17q; ² neurofibromatosis 2 (NF2) is caused by inactivating mutations of the NF2 gene on chromosome 22q; ^{3, 4} and Schwannomatosis is caused by germline mutations in SMARCB1 and LZTR1 genes. ⁵ The NF2 gene is a tumor suppressor gene that has 17 exons and codes for a protein termed merlin. This protein is a cytoskeletal protein that links actin filament to cell membrane ⁶.

Neurofibromatosis type 2 (NF2) is an autosomal dominant disease, which is characterized by bilateral vestibular schwannomas, multiple central and peripheral nervous system tumors and ocular manifestations. Its estimated incidence lies between 1 in 33,000 ⁷ live births and 1 in 87,410 live births ⁸. NF2 has a heterogeneous presentation and the disease severity range widely; from a single tumor developed later in life to multiple tumors developed in the first decade. There is also a diverse landscape of disease-causing NF2 mutations, including nonsense mutations, splice site mutations and missense mutations ⁹. Genotype-phenotype correlations in NF2 have been proposed, with nonsense and frameshift mutations being associated with the most severe clinical picture. Correlations between truncating mutations and ocular findings have also been observed ^{10, 11}.

Ocular abnormalities associated with NF2 are cataract, retinal pigment epithelial hamartomas, retinal hamartomas, epiretinal membranes (ERM) and paralytic strabismus. ^{12, 13, 14} In children with a severe phenotype, ophthalmological alterations such as

strabismus, cataract, ERM and retinal hamartomas usually are present before the typical neurological symptoms, and their recognition can help to reduce the delay in diagnosis of pediatric patients with NF2.

Optical coherence tomography (OCT) is a non-invasive imaging test that uses infrared light waves to produce high-resolution cross-section images of the retina. In the last years, the introduction of OCT in clinical practice provided the discovery of new NF2 specific alterations such as flame-shaped ERM, retinal tufts and retinal microhamartomas¹⁵. It is still poorly understood how the nature of the NF2 mutation affects the ocular involvement. The discovery of these subtle and specific retinal alterations and their phenotype-genotype correlation could serve in the direction of an appropriate medical treatment and monitoring and can help to better understand pathogenesis in NF2.

The present study aims to evaluate ophthalmological and molecular findings in eight patients with a clinical diagnosis of NF2. New mutations are described and variability in the ophthalmic phenotype and NF2 allelic heterogeneity are discussed.

Patients and Methods

The study was approved by the ethics committee of Federal University of Minas Gerais, Brazil, and followed the principles of the Declaration of Helsinki. All patients received written and oral information about the study and written consent was obtained from all subjects.

The subjects selected for the study were patients diagnosed with NF2 who were under the care of the neurofibromatosis outpatient reference center of Federal University of Minas Gerais, Brazil. The studied group included eight patients, five male and three females, with a mean age of 25 years (range 14 to 50 years). Patients 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were included in a previous study¹⁵. All patients fulfilled the Manchester criteria for NF2.

Eye examination was performed in 16 NF2 eyes, and it included measurement of the visual acuity and biomicroscopy before and after pupillary dilatation, dilated fundus examination, color fundus photography, infrared photography, fundus autofluorescence and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). SD-OCT was accomplished in 15 NF2 eyes; in one eye, OCT scans were not performed, due to a dense subcapsular lens opacity. SD-OCT examinations were performed by means of Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Ophthalmological exam was performed in at least one first degree relative of each patient.

Molecular analysis was performed with whole-exome sequencing using DNA derived from peripheral blood mononuclear cells from each individual. DNA was extracted from peripheral white blood cells in a high salt method using a QIAamp Blood DNA Mini Kit (Qiagen[®], Milano, Italy) according to the manufacturer's instructions. Sequencing with Illumina platform (HiSeq paired readings 2x75pb) and alignment with human genome reference (hg19) using BWA-MEM genotyping of variants of GATK was performed according to the best practices at Broad's Institute. Annotation and prediction of pathogenicity of variants using the in-house software for mutation prediction (Mendelics Abracadabra[®]), and checked in the Human Genome Mutation Database and ClinVar, associated with frequency control population, were performed.

The incidence of cataract, retinal abnormalities and other ocular involvement was analyzed. The relationship between specific ocular findings and different types of mutations of the NF2 gene were pointed and analyzed.

Results

The results are summarized in Table 1. All patients presented with bilateral vestibular schwannomas (BVS).

The overall delay between the onset of symptoms and diagnosis of NF2 averaged seven years. Of the eight patients, six had an early onset of NF2 (<20 years), and the delay between the first symptoms and diagnosis in this group was an average of 9.3 years (range 2 to 18 years) (Table 1). In half of the patients with early onset, the initial symptoms were ophthalmological disorders (two patients presented with strabismus and one patient with cataract) and the mean delay in diagnosis in these patients was 11 years. Late-onset of NF2 (> 20 years) was observed in two of eight patients, and their NF2 diagnosis was based on the discovery of BVS just a few months after the beginning of the first symptoms. The initial symptoms of these two patients were inferior limbs paresis and facial pain.

Ophthalmological features were present in all patients, and range widely from subtle retinal alterations, identified only by SD-OCT, to severe ocular involvement present at birth.

Cataracts were noted in five of eight patients (4 with early onset and 1 with late-onset). Cataracts were visually impacting in three eyes of three patients (Fig 1A and Fig 1B). One patient in the early onset group had chronic-appearing retinal detachment and retinal hamartoma in the right eye. Epiretinal membranes were noticed in all five patients in the early onset group (Fig 1C and Fig1D); four patients had thick ERM with a flame-shaped appearance on SD-OCT scans, and one patient had subtle ERM with fine undulations on the inner retinal surface. Retinal hamartomas were noted in four patients in the early onset group. In two patients, hamartomas were subclinical, detected only by SD-OCT (Fig 2D and Fig 2E). Choroidal nodules, similar to those described in NF1 patients, were found in three patients in the early onset group (Fig 3A and Fig 3B). All patients with epiretinal membrane, retinal hamartomas, and choroidal nodules were in the early onset group and presented with truncating mutations. Tufts of retinal internal layers

detected exclusively by SD-OCT (Fig 2A, Fig 2B and Fig 2C) were found in four patients, two patients had early onset NF2 and two had late-onset NF2. Paralytic strabismus was noted in three patients in the early onset group.

No first degree relative presented with NF2 specific ocular findings and the only ophthalmological alteration found in some of them were low ametropias.

Molecular Findings

Molecular analysis was performed with whole-exome sequencing. In the studied group, we found 3 categories of mutations: three patients with premature stop codon (nonsense) mutations, two patients with frameshift mutations and one patient with splice site mutation. Three novel mutations were found.

No germline mutations were detected in two patients with late-onset NF2. Those patients presented with retinal alterations, but they were subtle, and appear only in SD-OCT. The ophthalmological features and molecular findings of the eight NF2 patients are summarized in Table 1.

Discussion

To date, over 400 mutations in the NF2 gene have been described (HGMD, Human Gene Disease Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, accessed on 07 September 2018). The majority of these mutations were truncating mutations, leading to a smaller and probably non-functional protein product. The most common mutations in the NF2 gene are nonsense mutations and small deletions.^{16,9.}

About 25% of NF2 patients have a mosaic disease, in which only a proportion of cells contain the mutated *NF2* gene, frequently resulting in cases with a mild presentation. The initiating mutation occurs after conception, leading to two separate cell lineages. The proportion of cells affected depends on how early in development the mutation occurs^{17,}^{18,9.} Two patients in our series had late-onset NF2 and besides fulfilling the clinical

criteria, none mutations were found on them. We suppose them might have a mosaic pattern.

Different from previous studies^{10, 11}, at this sample, we observed ocular features in a 100% of the sample. The main difference between our group of patients and previous reports relies on retinal alterations found in patients with a mild phenotype and no germline mutations. To our knowledge, no retinal changes have been reported in patients without germline mutation. The retinal alterations found in our study were tufts of retinal internal layers identifiable only using SD-OCT. The differences in findings might be a technological issue since the use of SD-OCT was not usually reported. It is possible that with the inclusion of SD-OCT in clinical practice these subtle findings will be reported more frequently. Retinal tufts were first described by Chan C on histopathology exam of three patients with severe NF2¹⁹. Retinal tuft identifiable by SD-OCT was first described recently in a previous report involving patients 1, 2, 3, 4 and 5 of the present study¹⁵.

The relationship between choroidal nodules and NF1 have been well established. Choroidal findings are so prevalent in NF1 patients that some authors suggested that they should be included in the diagnostic criterion of NF1^{20, 21}. Unlike NF1, there is little information about choroidal changes in NF2¹⁵. Choroidal nodule in an NF2 patient was first described in a previous study including patient 4¹⁵. In our series, patients who presented with ophthalmological features as the first sign of NF2 also shown choroidal nodules in near-infrared imaging (Fig 3). Two of these patients had frameshift mutations and one patient had exon 2 splice site mutation (table 1). These findings are in accordance with previous reports associating constitutional splice site mutations in exon 1-5 to more severe disease. Exons 2 and 3 seems to be required for self-association of the amino terminal of the NF2 protein²². Frameshift mutations are also associated with more severe disease and retinal alterations in patients with NF2^{9,10}.

In both patients with nonsense C to T substitution, a stop codon was inserted resulting in a shorter protein. Clinically, one patient presented with multiple tumors in very young age, paralytic strabismus, cataract, subtle ERM and retinal hamartoma whereas the other presented with early onset NF2 and flame-shaped ERM.

Retinal hamartomas, epiretinal membranes and retinal tufts are part of a wide array of ocular abnormalities that occur in NF2. These retinal lesions are thought to result from developmental defects involving glial cells and the vascular epithelium; consequently, it has been suggested that they represent different faces of same pathological process ^{15, 19, 23, 24, 25, 26}. Until now, little has been reported on the ophthalmologic course in patients with NF2. It has been suggested that most NF2-specific ophthalmologic findings remain stable during the course of illness ¹³. Long-term follow up of retinal alterations with SD-OCT may improve comprehension of pathology and relationship between these lesions.

In conclusion, although this study has case-series limitations, including the small number of patients in a descriptive study; NF2 is a rare disease and there are only a few previous reports about the ocular findings. This study shed light and adds new information on both clinical and genetic features in NF2. Ocular alterations and the associated genetic features can pave for additional studies on the genotype-phenotype correlations in NF2.

Patient	Gender	Age	First Symptom	Mutation	Cataract	Hamartoma	Flame Shape ERM	Strabismus	Retinal tuft	Choroidal nodules
1	M	50 years	Limbs paresis	Negative	+	-	-	-	+	-
2	F	33 years	Facial pain	Negative	-	-	-	-	+	-
3	M	28 years	Convulsion	Nonsense chr22.30.050.691 C>T	+	+	-	+	-	-
4*	M	19 years	Strabismus	Frameshift chr22.30.064367.30.062.368 AG>A	+	-	+	+	-	+
5	M	14 years	Café au lait spots	Nonsense chr22.30.051.652 C>T	-	-	+	-	+	-
6*	F	24 years	Limbs paresis	Frameshift chr22:30.057.260-30.057.268 AACAGACTG>A	-	+	+	-	-	-
7	M	16 years	Cataract	Intronic, 2pb chr22.30.069.477 T>G	+	+	+	-	-	+
8*	F	15 years	Strabismus	Frameshift chr22.30.032.802.30.032.809 CTGGTTCT>C	+	+	+	+	+	+

Table 1. The main ophthalmological and molecular characteristics of the studied group of patients with NF2

* Patients with novel mutations

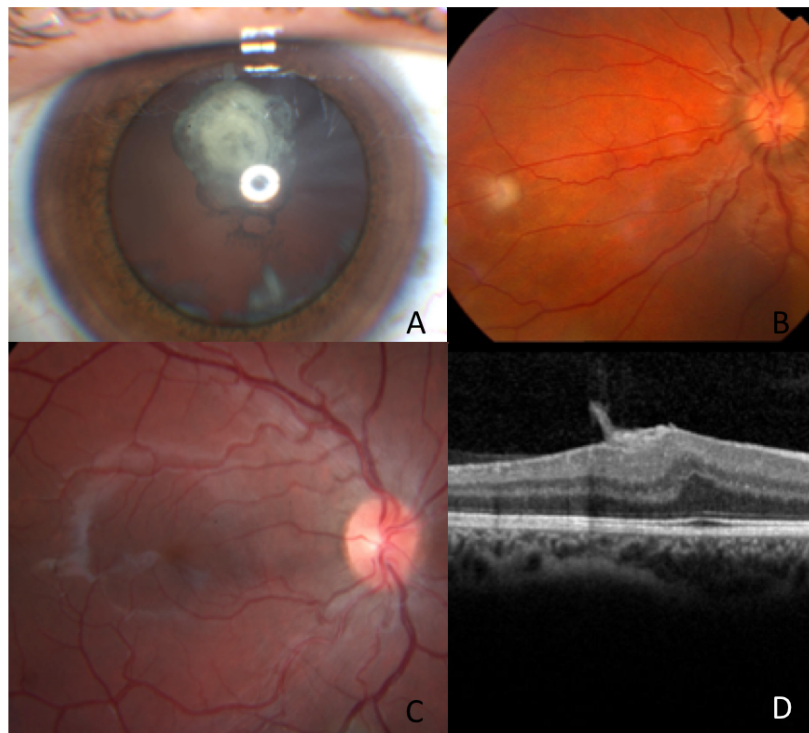


Figure 1. **A)** Anterior segment photography of case 1 showing typical subcapsular and cortical cataract. **B)** Retinography of case 6 showing a retinal hamartoma. **C)** Retinography of case 5 showing a typical NF2 ERM. **D)** SD-OCT of case 5 showing the ERM with the characteristic flame shape appearance.

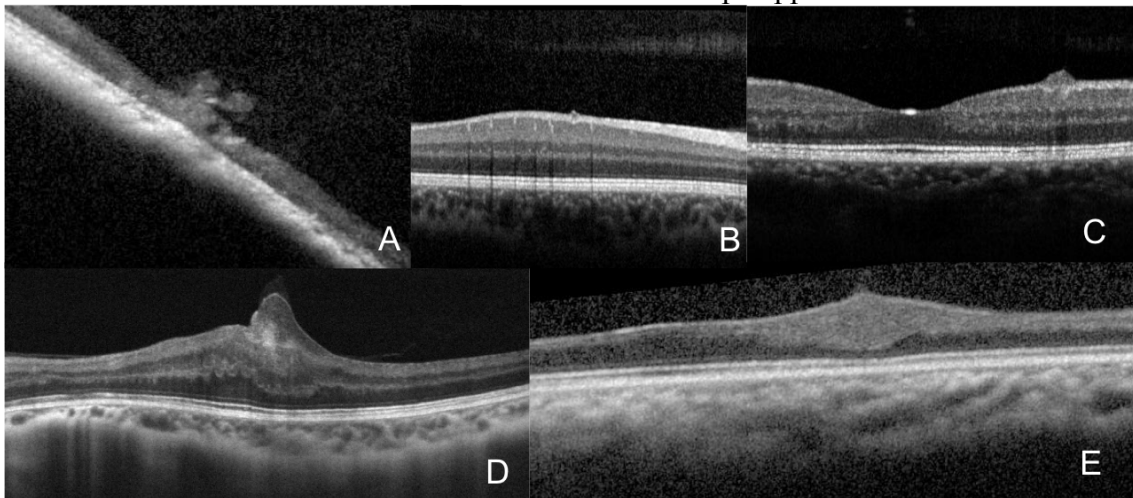


Figure 2. **A)** SD-OCT of case 8 showing a peripheral retina tuft. **B)** SD-OCT of case 5 showing a small retinal tuft in the macular region. **C)** SD-OCT of case 2 showing an evident retinal tuft in parafoveal region. **D)** SD-OCT of case 7 showing a small retinal hamartoma evident only by SD-OCT. **E)** SD-OCT of case 8 showing an intraretinal retinal hamartoma.

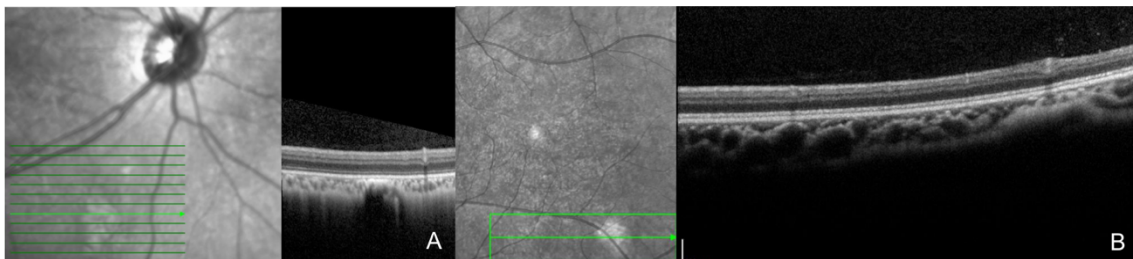
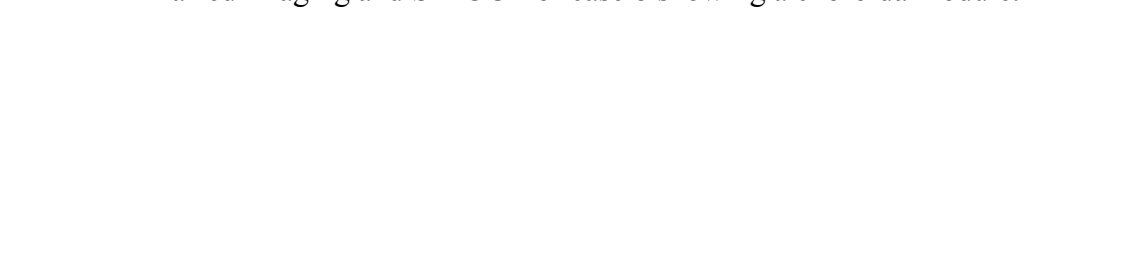


Figure 3. **A)** Infra-red imaging and SD-OCT of case 4 showing a choroidal nodule. **B)** Infra-red imaging and SD-OCT of case 8 showing a choroidal nodule.



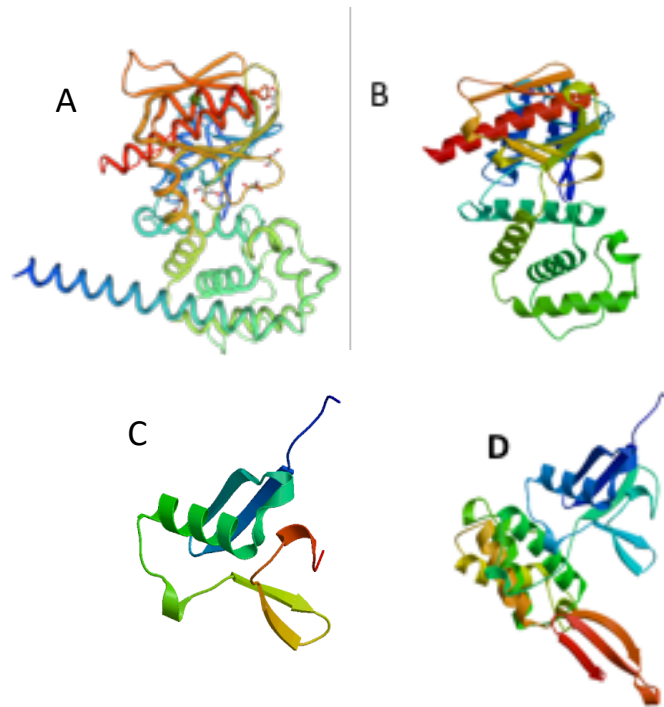


Figure 4. Structure modeling of wild type and frameshift mutations of NF2 gene with SWISS-MODEL. **A)** 3D model of wild type NF2 protein. **B)** 3D model of variant NF2 chr22:30.064.367- 30.064.368 AG > A p.Ala313Pro fs*9. **C)** Protein structure of variant chr22:30.032.802 -30.032.809 CTGGTTCT > C p.Trp60Leu fs*9. **D)** 3D model of variant chr22:30.057.260 30.057.268 AACAGACTG > A p.Arg249Pro fs*9.

Compliance with Ethical Standards:

Funding: This study was partially funded by FAPEMIG (Grupos Emergentes).

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this article.

Ethical approval:

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

All procedures performed in the study involving human participants were in accordance with ethical standards of the institutional committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References:

1. NIH conference statement. Neurofibromatosis 1 (von Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *Ann Intern Med* 1990; 113: 39-52.
2. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ et al. Genetic Linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 1987; 49: 589-594.
3. Roleau G, Seizinger BR, Ozelius LG, et al. Genetic Linkage analysis of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 1987; 329:246-248.
4. Cooper J, Giancotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett* 2014; 16: 2743-2752.
5. Rodrigues LO, Batista PB, Goloni-Bertollo EM, et al. Neurofibromatosis part 1 – diagnosis and differential diagnosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014; 72: 241-250.
6. Basser ME, Kuramoto L, Woods R, et al. The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2. *J Med Genet.* 2005; 42: 540-546.
7. Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet* 2010 ; 152A: 327-332.
8. Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J. Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology.* 2000; 54: 71-76.

9. Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): A clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 16.
10. Feucht M, Kluwe L, Mautner VF, Richard G. Correlation of nonsense and frameshift mutations with severity of retinal abnormalities in neurofibromatosis 2. *Arch Ophthalmol* 2008; 126: 1376-1380.
11. Parry DM, MacCollin MM, Kaiser-Kupfer MI et al. Germ-line Mutations in the Neurofibromatosis 2 Gene: Correlations with Disease Severity and Retinal Abnormalities. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 529-539.
12. Kaye LD, Rothner AD, Beauchamp GR, Meyers SM, Estes ML. Ocular findings associated with neurofibromatosis type II. *Ophthalmology*. 1992; 99: 1424-1429. (15)
13. Bosch MM, Boltshauser E, Harpes P, Landau K. Ophthalmologic findings and a long-term course in patients with neurofibromatosis type 2. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 1068-1077. (16)
14. Feucht M, Griffiths B, Niemüller I, Haase W, Richard G, Mautner VF. Neurofibromatosis 2 leads to higher incidence of strabismological and neuro-ophthalmological disorders. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 882-886. (17)
15. Waisberg V, Rodrigues LO, Nehemy MB, Frassom M, De Miranda DM. Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Findings in Neurofibromatosis Type 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: OCT262-267.
16. Ahronowitz I, Xin W, Kiely R, Sims K, Maccollin M, Nunes FP. Mutational spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings. *Hum Mutat*. 2007;28:1-12
17. Kluwe L, Mautner V, Heinrich B, et al. Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet* 2003; 40: 109-114. (13)
18. Kluwe L, Mautner VF. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2051-2055. (14)

19. Chan C, Koch CA, Kaiser-Kupfer MI, et al. Loss of heterozygosity for the NF gene in retinal and optic nerve lesions of patients with neurofibromatosis 2. *J Pathol* 2002; 198: 14-20.
20. Viola F, Villani E, Natacci F, et al. Choroidal abnormalities detected by near-infrared reflectance imaging as a new diagnostic criterion for neurofibromatosis 1. *Ophthalmology* 2012; 119: 369-375.
21. Moramarco A, Giustini S, Nofroni I, Mallone F, Miraglia E, Lacovino C, Calvieri S, Lambiase A. Near-infrared imaging: an in vivo, non-invasive diagnostic tool in neurofibromatosis type 1. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018; 256: 307-311.
22. Baser ME, Kuramoto L, Woods R, Joe H, Friedman JM, Wallace AJ, et al. The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2. *J Med Genet*. 2005; 42: 540-546.
23. Landau K, Yasargil GM. Ocular fundus in neurofibromatosis type 2. *Br J Ophthalmol* 1993; 77: 646-649.
24. Meyers SM, Gutman FA, Kaye LD, Rothner AD. Retinal changes associated with neurofibromatosis 2. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1995; 93: 245- 257.
25. Sisk RA, Berrocal AM, Scheffler AC, Dubovy SR, Bauer MS. Epirretinal membranes indicate a severe phenotype of neurofibromatosis type 2. *Retina* 2010; 30: 51-58.
26. McLaughlin ME, Pepin SM, MacCollin MM, Choopong P, Lessell S. Ocular Pathologic Findings of Neurofibromatosis Type 2. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 389-394.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Todas as mutações identificadas no nosso estudo foram mutações truncadas, incluindo três mutações que ainda não foram descritas na literatura.

- Em nossa série, a SD-OCT evidenciou alterações retinianas em todos os pacientes com NF2, inclusive nos pacientes com fenótipo leve da doença e sem mutações germinativas identificáveis no exame genético.

- Dois pacientes da nossa série tiveram NF2 de início tardio, e apesar de preencherem os critérios diagnósticos para NF2, nenhuma mutação foi encontrada neles. Podemos supor que eles apresentam um padrão mosaico. Destaca-se que para a confirmação de mosaicismo é preciso identificar a mutação do gene NF2 em algum tumor de sistema nervoso.

- Com a ajuda da SD-OCT foi possível identificar alterações oculares que ainda não haviam sido descritas clinicamente na NF2, como os tufos de retina e nódulos de coróide.

- Membranas epirretinianas na NF2 possuem características únicas que as diferenciam de MER idiopáticas e MER associadas a outras doenças. A detecção desta MER peculiar em um paciente jovem é muito sugestiva de NF2. Sua inclusão nos critérios diagnósticos da doença poderá ser considerada a medida que os achados deste estudo passem a ser relatados em estudos envolvendo maior número de pacientes com suspeita e NF2 confirmada.

- Apesar deste estudo apresentar as limitações de uma série de casos, incluindo o pequeno número de pacientes em um estudo descritivo; a NF2 é uma doença rara, e existem apenas poucos estudos sobre os achados oculares e moleculares.

- Este estudo acrescenta novas informações e pode ajudar a aumentar o conhecimento sobre as características clínicas e genéticas da NF2. A relação entre as alterações oculares e os achados genéticos associados pode ser usada em estudos adicionais sobre as correlações fenótipo-genótipo na NF2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NIH conference statement. Neurofibromatosis 1 (von Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *Ann Intern Med* 1990; 113: 39-52.
2. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ et al. Genetic Linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 1987; 49: 589-594.
3. Roleau G, Seizinger BR, Ozelius LG, et al. Genetic Linkage analysis of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 1987; 329:246-248.
4. Cooper J, Giancotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett* 2014; (16): 2743-2752.
5. **Rodrigues LO, Batista PB, Goloni-Bertollo, et al. Neurofibromatoses: part 1 – diagnosis and differential diagnosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(3):241-250.**
6. Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): A clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis* 2009; (4): 16.
7. Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med.* 1992 Aug; 84 (304): 603-18.
8. Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet* 2010 Feb; 152A (2): 327-32.
9. Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J. Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology.* 2000 Jan 11; 54 (1): 71-6.
10. Legoix P, Sarkissian HD, Cazes L, Giraud S, Sor F, Roleau GA, Lenoir G, Thomas G, Zucman-Rossi J. Molecular Characterization of germline NF2 gene rearrangements. *Genomics.* 2000;65:62-66.
11. Cooper J, Giancotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett.* 2014;16:2743-2752.
12. Moon KH, Kim HT, Lee D, Rao EM, Lim DS, KIM JW. Differential Expression of NF2 in Neuroepithelial Compartments is Necessary for Mammalian Eye Development. *Developmental Cell.* 2018;44: 1-16.

13. Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI et al. Neurofibromatosis 2 (NF): clinical characteristics of 63 affected individual and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet* 1994; 52: 450-461.
14. Eldridge R, Parry DM, Kaiser-Kupfer MI. Neurofibromatosis 2: clinical heterogeneity and natural history in 39 individual in 9 families and 16 sporadic cases. *Am J Hum Genet Suppl* 1991; 49: A676.
15. Gardner WJ, Frazier CH. Bilateral acoustic neurofibromatosis: a clinical study and field survey of a family of five generations with bilateral deafness in thirty-eight members. *Arch Neurol Psychiatry* 1930; 23: 266-302.
16. Kluwe L, Mautner V, Heinrich B, et al. Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet* 2003; 40: 109-114.
17. Kluwe L, Mautner VF. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2051-2055.
18. Baser, ME, Kluwe L, Mautner VF. Germ-line NF2 mutations and disease severity in neurofibromatosis type 2 patients with retinal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 1999;64:1230-1233.
19. Kaye LD, Rothner AD, Beauchamp GR, Meyers SM, Estes ML. Ocular findings associated with neurofibromatosis type II. *Ophthalmology.* 1992; 99 (9): 1424-9.
20. Bosch MM, Boltshauser E, Harpes P, Landau K. Ophthalmologic findings and a long-term course in patients with neurofibromatosis type 2. *Am J Ophthalmol* 2006;141 (6): 1068-1077.
21. Feucht M, Griffiths B, Niemüller I, Haase W, Richard G, Mautner VF. Neurofibromatosis 2 leads to higher incidence of strabismological and neuro-ophthalmological disorders. *Acta Ophthalmol* 2008; 86 (8): 882-886.
22. Landau K, Yasargil GM. Ocular fundus in neurofibromatosis type 2. *Br J Ophthalmol* 1993; 77: 646-649.
23. Meyers SM, Gutman FA, Kaye LD, Rothner AD. Retinal changes associated with neurofibromatosis 2. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1995; 93: 245- 257.
24. Feutch M, Kluwe Lan, Mautner V, Richard G. Correlation of nonsense and frameshift mutations with severity of retinal abnormalities in neurofibromatosis 2. *Arch Ophthalmol* 2008; 126 (10): 1376-1380
25. Sisk RA, Berrocal AM, Scheffler AC, Dubovy SR, Bauer MS. Epirretinal membranes indicate a severe phenotype of neurofibromatosis type 2. *Retina* 2010; 30: 51-58.

26. Scheffler AC, Dubovy SR, Berrocal AM. Optical coherence tomography characteristics of epiretinal membranes in neurofibromatosis 2. *Ophthalmic Surg Lasers imaging* 2008; 39: 73-77.
27. Parry DM, MacCollin MM, Kaiser-Kupfer et al. Germ-Line Mutations in the Neurofibromatosis 2 Gene: Correlations with Disease Severity and Retinal Abnormalities. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 529-539.
28. Evans DGR, Birch JM, Ramsden RT. Paediatric presentation of type 2 neurofibromatosis. *Arch Dis Child*. 1999; 81 (6): 496-499.
29. Parry A, Giannini C, Raghavan R et al. Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 994-1003.
30. McLaughlin ME, Pepin SM, MacCollin MM, Choopong P, Lessell S. Ocular Pathologic Findings of Neurofibromatosis Type 2. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 389-394.
31. Han DP¹, Chin M, Simons KB, Albert DM. Surgical removal of an atypical macular epiretinal membrane in neurofibromatosis type 2: clinicopathologic correlation and visual outcome. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130 (10): 1337-9.
32. Chan C, Koch CA, Kaiser-Kupfer MI, et al. Loss of heterozygosity for the NF gene in retinal and optic nerve lesions of patients with neurofibromatosis 2. *J Pathol* 2002; 198: 14-20.
33. Viola F, Villani E, Natacci F, et al. Choroidal abnormalities detected by near-infrared reflectance imaging as a new diagnostic criterion for neurofibromatosis 1. *Ophthalmology* 2012; 119: 369-375.
34. Moramarco A, Giustini S, Nofroni I, Mallone F, Miraglia E, Lacovino C, Calvieri S, Lambiase A. Near-infrared imaging: an in vivo, non-invasive diagnostic tool in neurofibromatosis type 1. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018; 256: 307-311.
35. Song BJ¹, Ko MK, Choe JK. Ultrastructural change of the Müller cell in the culture of sensory retina. *Korean J Ophthalmol*. 1995; 9 (2): 84-88.
36. Schachat AP, Shields JA, Fine SL, et al. Combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmology*. 1984; 91 (12): 1609-15.
37. Shields CL¹, Mashayekhi A, Luo CK, Materin MA, Shields JA. Optical coherence tomography in children: analysis of 44 eyes with intraocular tumors and simulating conditions. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2004; 41 (6): 338-44.

38. Demange L, Moncuit C, Thomas G, Olschwang S. Analyse phénotypique de 154 patients porteurs d'une mutation constitutionnelle du gene NF2. *Rev Neurol*. 2007;163 (11): 1031-1038
39. Bourn D, Evans G, Mason S, Tekes S, Trueman L, Strachan T. Eleven novel mutations in the NF2 tumor suppressor gene. *Human Genetics*. 1995; 95 (5): 572-574
40. Wallace AJ, Watson CJ, Oward E, Evans DGR, Elles RG. Mutation Scanning of the NF2 gene: an improved service based on meta-PCR/sequencing, dosage analysis, and loss of heterozygosity analysis. *Genetic testing*. 2004; 8 (4): 368-380
41. Baser ME, Kuramoto L, Woods R, et al. The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2. *J Med Genet*. 2005; 42: 540-546.
42. Fujimoto J, Swanson E. The development, commercialization, and impact of optical coherence tomography *Inves Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: OCT262

ANEXO 1 – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Paciente 1

Paciente do sexo masculino, com 50 anos de idade, apresentou como primeiro sintoma relacionado com a NF2 paresia de membros inferiores aos 47 anos de idade. O diagnóstico de NF2 foi estabelecido também aos 47 anos com base no achado de schwannomas vestibulares bilaterais. Como critérios diagnósticos da doença possui schwannomas vestibulares bilaterais, meningioma e catarata.

A análise molecular através do sequenciamento por exoma completo não identificou variantes patogênicas.

No exame oftalmológico a acuidade visual corrigida foi de 20/100 no olho direito (OD) e 20/20 no olho esquerdo (OE). A pressão intraocular foi 13mmHg no OD e 14mmHg no OE. À biomicroscopia observamos catarata subcapsular posterior e cortical no OD (Figura 3A) e nevus de carúncula no OE. O exame de fundoscopia com biomicroscopia de fundo e oftalmoscopia binocular indireta estava dentro da normalidade em ambos os olhos (AO).

A SD-OCT revelou pequenas elevações da CFNR na região foveal do OE. A microarquitetura da retina, o contorno foveal e a zona elipsoide estavam preservadas. Não identificamos descolamento da hialoide posterior. A SD-OCT estava dentro da normalidade no OD (Figura 3).

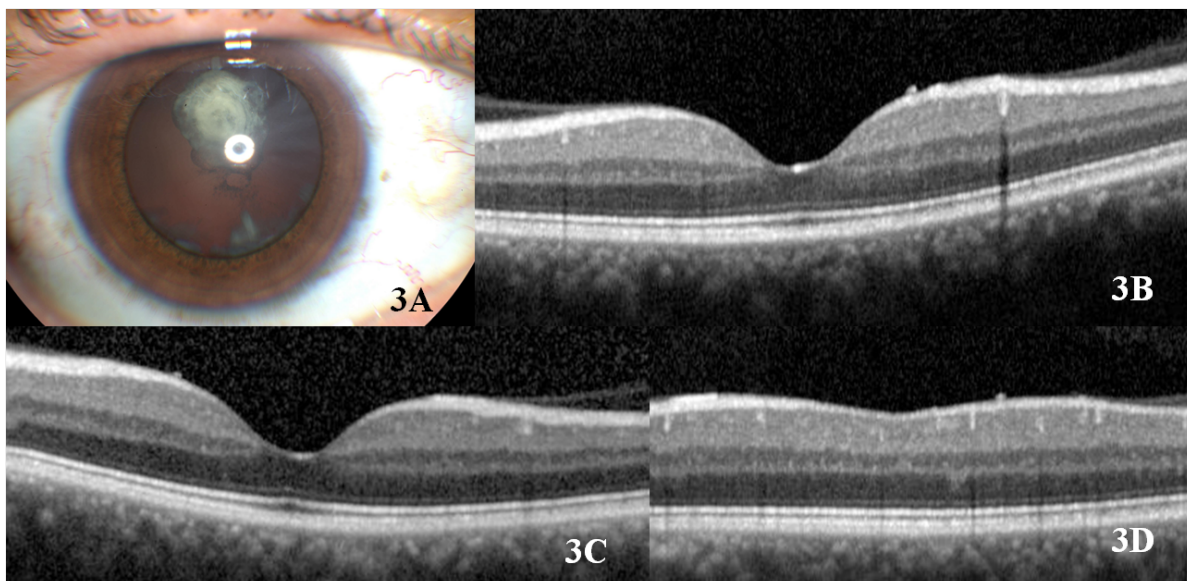


Figura 3. A) Fotografia colorida do segmento anterior do OD mostrando catarata subcapsular posterior típica da NF2. B) SD-OCT do OE mostrando pequenas elevações da CFNR; o contorno foveal e a microarquitetura da retina estão preservados; AVM está presente. C) Imagem mostrando pequena elevação da CFNR em outra localização da fóvea. D) Corte ótico evidenciando mais uma pequena elevação da CFNR.

Paciente 2

Paciente do sexo feminino, 33 anos de idade, teve como primeiros sintomas da NF2 dor facial aos 30 anos de idade. O diagnóstico de NF2 foi estabelecido aos 30 anos com base no achado de schwannomas vestibulares bilaterais. Como critérios diagnósticos possui schwannomas vestibulares bilaterais e meningiomas.

A análise molecular através do sequenciamento por exoma completo não identificou variantes patogênicas.

Ao exame oftalmológico a acuidade visual foi de 20/20 em ambos os olhos, sem correção. A pressão intraocular estava 12mmHg em ambos os olhos e biomicroscopia dentro da normalidade em ambos os olhos. Ao exame de fundoscopia com biomicroscopia de fundo e oftalmoscopia binocular indireta identificamos edema leve de discos ópticos bilateralmente, provavelmente associado ao crescimento recente de um meningioma intracraniano.

A SD-OCT revelou pequena elevação da CFNR na região macular do OD. A microarquitetura da retina, o contorno foveal e a zona elipsoide estavam preservados nos dois olhos (Figura 4). Não identificamos descolamento da hialoide posterior.

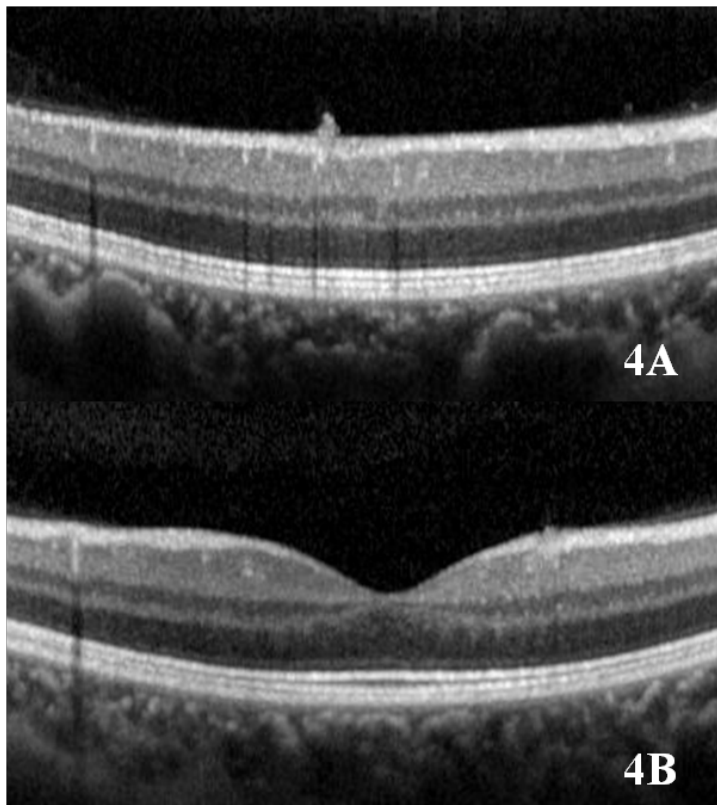


Figura 4. A) SD-OCT do OD mostrando elevação focal da CFNR. B) SD-OCT do OD mostrando interrupção da MLI com pequena elevação da CFNR na região foveal. O contorno foveal e a microarquitetura da retina estão preservados.

Paciente 3

Paciente do sexo masculino, 28 anos de idade, teve como primeiras manifestações da NF2 convulsão e paralisia do nervo oculomotor direito aos 8 anos de idade. Como critérios diagnósticos apresenta schwannomas vestibulares bilaterais, múltiplos meningiomas e catarata.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22:30.050.691 C>T, que promove a substituição do aminoácido glutamina na posição 165 por códon de parada da tradução proteica (p. Gln 165*). Esta variante que leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e já foi previamente descrita na literatura ⁽³²⁾.

Ao exame oftalmológico a acuidade visual foi de vultos no OD e 20/20 sem correção no OE. O paciente apresentava exotropia de grande ângulo, hipotropia e ptose palpebral

secundárias a paralisia do nervo craniano oculomotor direito. A pressão intraocular foi 15mmHg no OD e 14mmHg no OE. À biomicroscopia observamos catarata subcapsular posterior leve em AO. Ao exame de fundoscopia com biomicroscopia de fundo e oftalmoscopia binocular indireta identificamos descolamento de retina total, com aspecto crônico e um hamartoma de retina no OD (Figura 5A). O hamartoma tinha aspecto elevado, com coloração esbranquiçada, medindo aproximadamente meio diâmetro de disco, localizado na média periferia temporal. No olho esquerdo o exame de fundo de olho estava dentro da normalidade.

A SD-OCT revelou no OD descolamento de retina e um hamartoma de retina com conteúdo hiperrefletivo. No tumor havia desorganização de múltiplas camadas da retina, interrupção da zona elipsoide e MER na sua superfície. No olho esquerdo a SD-OCT evidenciou uma MER tênue com finas ondulações da superfície interna da retina na região foveal. A microarquitetura da retina e a espessura retiniana estavam preservadas (Figura 5). Não identificamos descolamento da hialoide posterior.

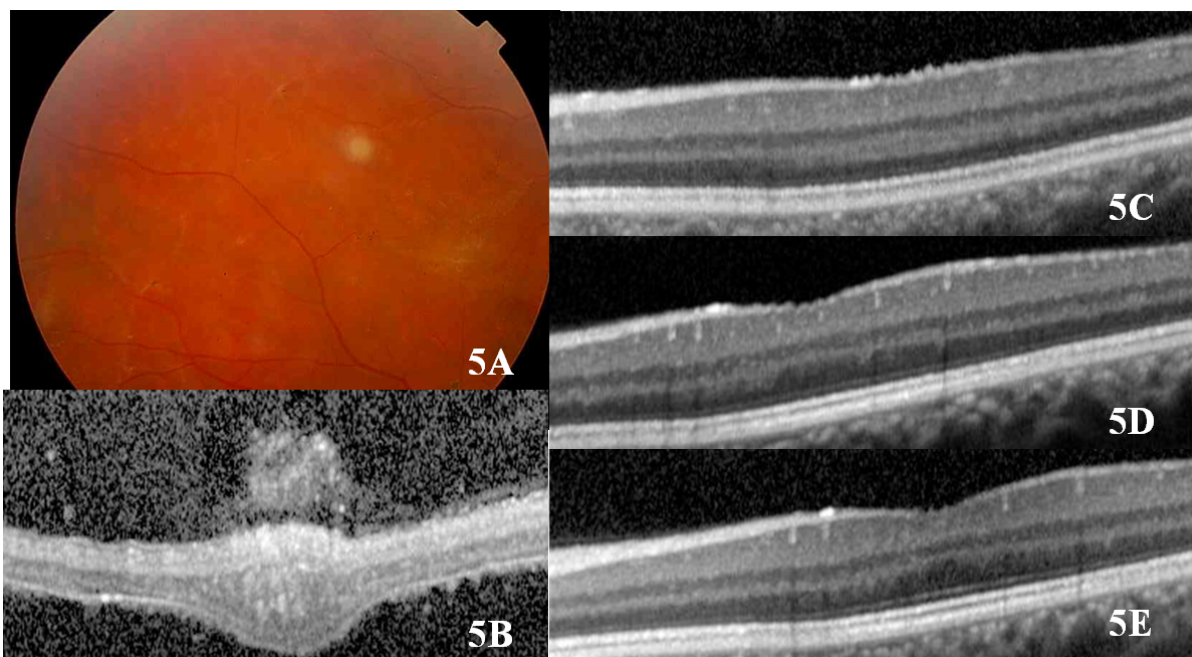


Figura 5. **A)** Retinografia colorida do OD mostrando hamartoma de retina temporal em uma retina descolada. **B)** SD-OCT do OD mostrando hamartoma de retina com conteúdo hiperrefletivo em retina descolada, com MER na superfície do tumor. **(C)** SD-OCT do OE evidenciando MER tênue com finas ondulações espiculadas na superfície interna da retina. **D)** Imagem de outro ponto da mácula do OE mostrando finas ondulações da

superfície interna da retina. **E)** Corte evidenciando ondulações espiculadas da superfície interna da retina na região foveal do OE.

Paciente 4

Paciente do sexo masculino, 19 anos de idade, teve como primeira manifestação da NF2 estrabismo aos 2 anos de idade. Aos 14 anos de idade apresentou paresia da mão esquerda e um ano depois hipoacusia e paralisia facial do lado esquerdo. Como critérios diagnósticos apresenta schwannomas vestibulares bilaterais, múltiplos meningiomas e catarata.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22:30.064.367 AG>A, que promove a substituição do aminoácido alanina na posição 313 por prolina e, a partir deste ponto, mudança da matriz de leitura, levando a interrupção prematura da tradução proteica (p.Ala313Profs*9). Esta variante que leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e nunca foi previamente descrita na literatura médica.

No exame oftalmológico a acuidade visual corrigida foi de conta dedos no OD e 20/40 no OE. No olho direito havia estrabismo convergente e hipotropia fixos. À biomicroscopia observamos catarata subcapsular posterior densa e central em ambos os olhos, maior no olho direito (Figura 6A); leucomas na córnea do olho direito e ceratite de exposição moderada no olho esquerdo. A tonometria foi 12mmHg em AO. O exame de fundoscopia com biomicroscopia de fundo e oftalmoscopia binocular indireta do olho direito foi prejudicado pela opacidade de meios e estrabismo fixo. No olho esquerdo identificamos uma membrana epirretiniana espessa na região macular (Figura 6B).

A SD-OCT do OD não foi realizada devido opacidade de meios. No OE a SD-OCT evidenciou MER com várias camadas, em forma de chama de vela se estendendo para o vítreo na região foveal e perda do contorno foveal. A espessura retiniana estava aumentada, com CMT de 555 μm e a zona elipsoide estava preservada (Figura 6). Não identificamos descolamento da hialoide posterior.

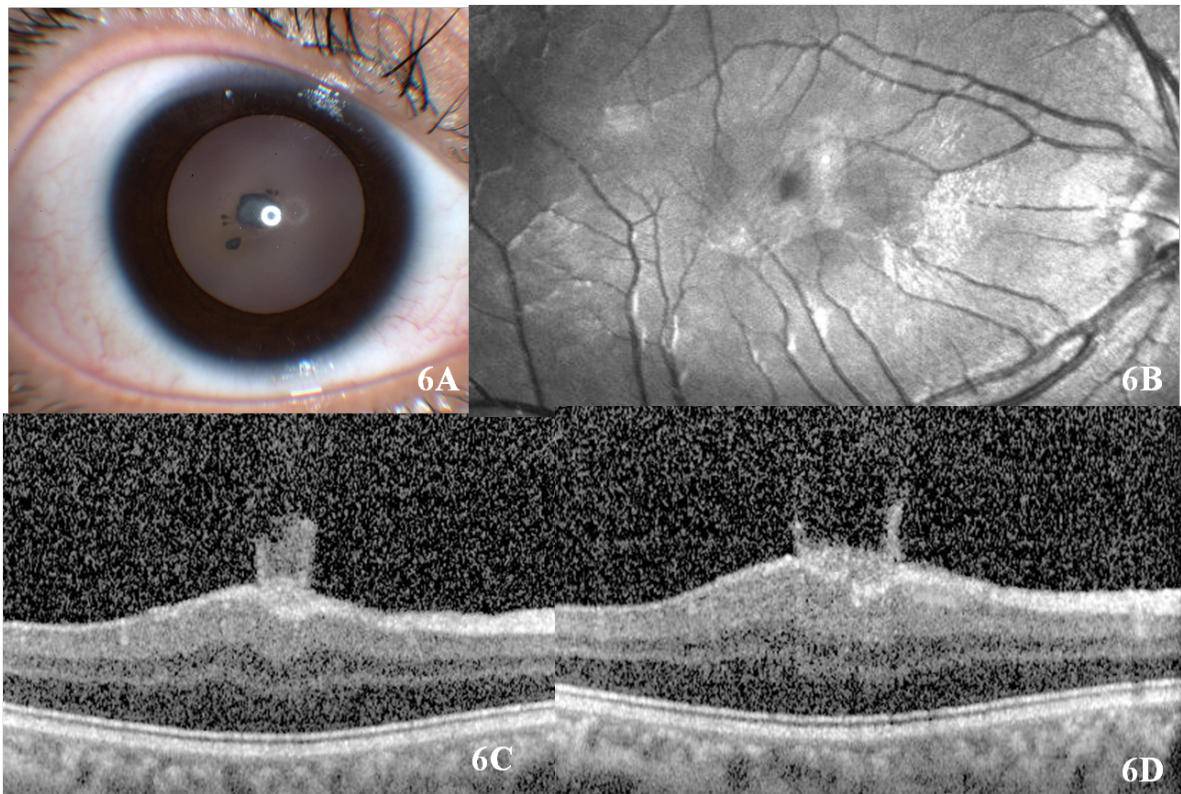


Figura 6. **A)** Fotografia colorida do seguimento anterior do OE mostrando catarata central subcapsular posterior. **B)** Retinografia com filtro *red-free* do OD evidenciando MER espessa na região foveal. **C)** SD-OCT mostrando MER espessa em forma de chama de vela se estendendo para o vítreo. **D)** Outra imagem da região foveal do OD mostrando MER em chama de vela com aumento de espessura macular e zona elipsoide preservada.

Paciente 5

Paciente do sexo masculino, com 14 anos de idade, teve como primeira manifestação manchas café com leite. Aos 9 anos de idade iniciou com hipoacusia e o diagnóstico de NF2 foi estabelecido após a identificação de schwannomas vestibulares bilaterais.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22:30.051.652 C>T, que promove a substituição do aminoácido arginina na posição 196 por códon de parada da tradução proteica (p. Ala 196*). Esta variante que leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e já foi previamente descrita na literatura ⁽³³⁾.

No exame oftalmológico a acuidade visual foi 20/20 com correção no OD e 20/20 sem correção no OE. A biomicroscopia estava dentro da normalidade nos dois olhos. A

tonometria estava 13 mmHg no OD e 15 mmHg no OE. No exame de fundoscopia identificamos uma membrana epirretiniana espessa na mácula do OD sem outras anormalidades (Figura 7A).

A SD-OCT evidenciou a presença de MER espessa, em forma de chama de vela, com bordas se estendendo para o vítreo na região macular do OD. Havia perda da depressão foveal, aumento da espessura retiniana com uma CMT de 443 μm e preservação da zona elipsoide (Figura 7). Não identificamos descolamento da hialoide posterior. Os achados tomográficos neste paciente eram muito semelhantes aos do paciente 4. A SD-OCT do OE não evidenciou anormalidades.

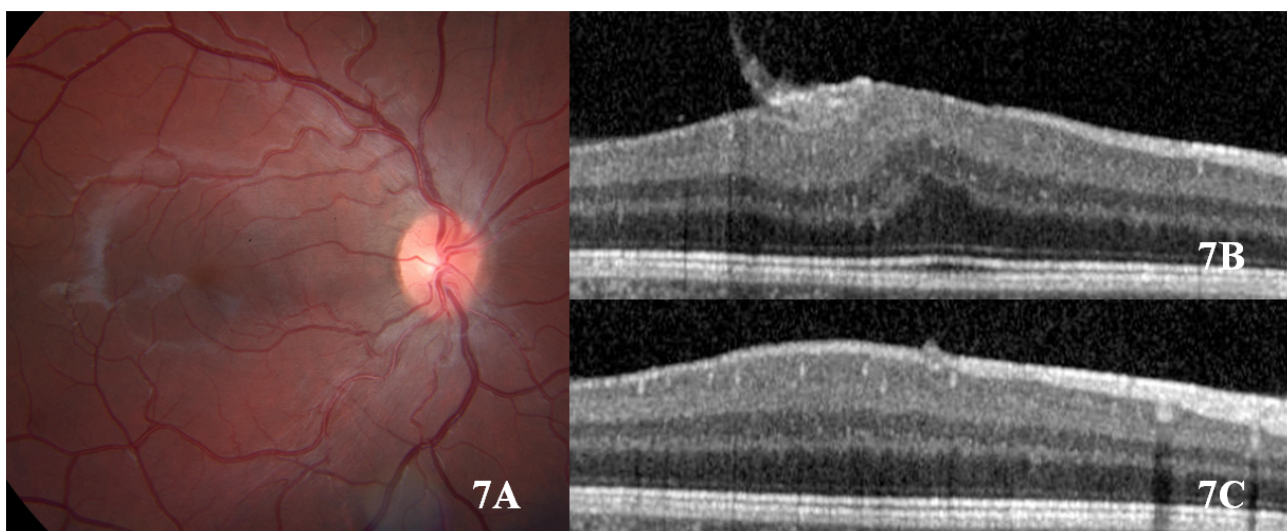


Figura 7. A) Retinografia colorida do OD mostrando MER espessa temporal à fóvea. B) SD-OCT do OD mostrando MER espessa em forma de chama de vela com bordas elevadas se estendendo para o vítreo semelhante a MER encontrada no paciente 4. C) Imagem evidenciando pequena elevação focal da CFNR no OD.

Paciente 6

Paciente do sexo feminino, 24 anos de idade, teve como primeira manifestação da NF2 paresia de membros inferiores secundária a meningiomas centrais aos 18 anos. O diagnóstico de NF2 foi estabelecido aos 19 anos de idade com base nos achados de schwannomas vestibulares bilaterais e múltiplos meningiomas. A paciente havia sido submetida à neurocirurgia para remoção de meningiomas do SNC seis meses antes da avaliação oftalmológica.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22: 30.032.802 CTGGTTCT>C, que promove a substituição do aminoácido triptofano na posição 60 por leucina e, a partir deste ponto, mudança da matriz de leitura, levando a interrupção prematura da tradução proteica (p.Trp60Leufs*61). Esta variante que leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e nunca foi previamente descrita na literatura médica.

Ao exame oftalmológico a acuidade visual foi de 20/25 com correção no OD e 20/20 com correção no OE. A pressão intraocular foi 12mmHg no OD e 11mmHg no OE. À biomicroscopia não observamos alterações. À fundoscopia com biomicroscopia de fundo e oftalmoscopia binocular indireta identificamos edema leve de disco óptico bilateral, MER espessa na macula do OD (Figura 8A) e hamartoma de retina no OE (Figura 8B). O hamartoma era uma lesão elevada, de coloração esbranquiçada, localizada na média periferia nasal.

A SD-OCT revelou no OD uma MER espessa com bordas se estendendo para o vítreo da região macular. Havia descolamento parcial do vítreo, com AVM; zona elipsoide preservada; leve desorganização das camadas internas da retina; perda do contorno foveal e aumento de espessura macular, com uma CMT de 363 μ m. No OE a SD-OCT revelou MER com formato em chama de vela na mácula, porém com preservação da espessura, do contorno foveal e microarquitetura retiniana. As imagens do hamartoma de retina mostraram um tumor endofítico com conteúdo hiperrefletivo e desorganização das camadas internas e externas da retina. Havia MER na superfície do tumor e a zona elipsoide estava apagada (Figura 8).

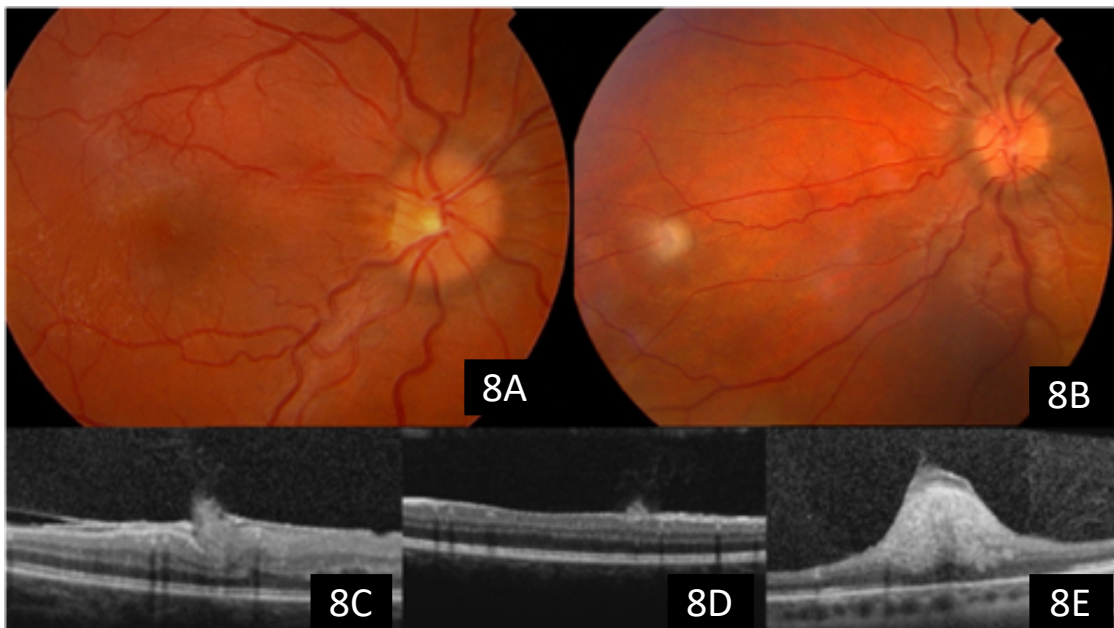


Figura 8. **A)** Retinografia colorida do OD mostrando MER com reflexo em celofane e tração vascular na mácula. **B)** Retinografia colorida do OE mostrando hamartoma de retina no setor nasal, semelhante ao encontrado no paciente 3. **C)** SD-OCT do OD mostrando MER espessa se estendendo para o vítreo; pode-se observar interrupção da MLI e desorganização das camadas internas da retina. A zona elipsoide está preservada. **D)** SD-OCT do OE evidenciando MER focal em forma de chama de vela na mácula; **E)** SD-OCT do hamartoma de retina do OD mostrando lesão endofítica elevada com conteúdo hiperrefletivo e desorganização das camadas internas e externas da retina e associada à MER na sua superfície.

Paciente 7

Paciente do sexo masculino, 16 anos de idade, teve como primeira manifestação da NF2 catarata descoberta aos 06 anos de idade. O diagnóstico foi estabelecido aos 15 anos com base na presença de múltiplos meningiomas e schwannoma vestibular bilateral.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22:30.069.477 T>G, que promove alteração em sítio canônico de processamento do RNA mensageiro (sítio doador de splicing), possivelmente levando a formação de RNAm anômalo. Esta variante, que provavelmente leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e já foi previamente descrita na literatura médica ⁽³⁴⁾.

Ao exame oftalmológico a acuidade visual foi 20/200 com correção em AO. A baixa acuidade visual era recente e foi associada a palidez bilateral de disco óptico secundária à neurocirurgia para remoção de meningioma intracraniano. A biomicroscopia evidenciou presença de pseudofacia no OE. Ao exame de fundoscopia observamos presença de discreta lesão puntiforme, brancacenta na região macular do OE e palidez de disco óptico bilateral secundária. A SD-OCT revelou tratar-se de pequeno hamartoma retiniano. A depressão foveal estava ausente, a espessura macular estava aumentada com uma CMT de $352\ \mu\text{m}$, havia descolamento parcial da hialoide posterior, com AVM e a zona elipsoide preservada na região macular do OE (Figura 9A e 9B). A SD-OCT evidenciou também a presença de nódulo de coroide extra-macular no OD, semelhante aos descritos em pacientes com NF1 (Figura 9C).

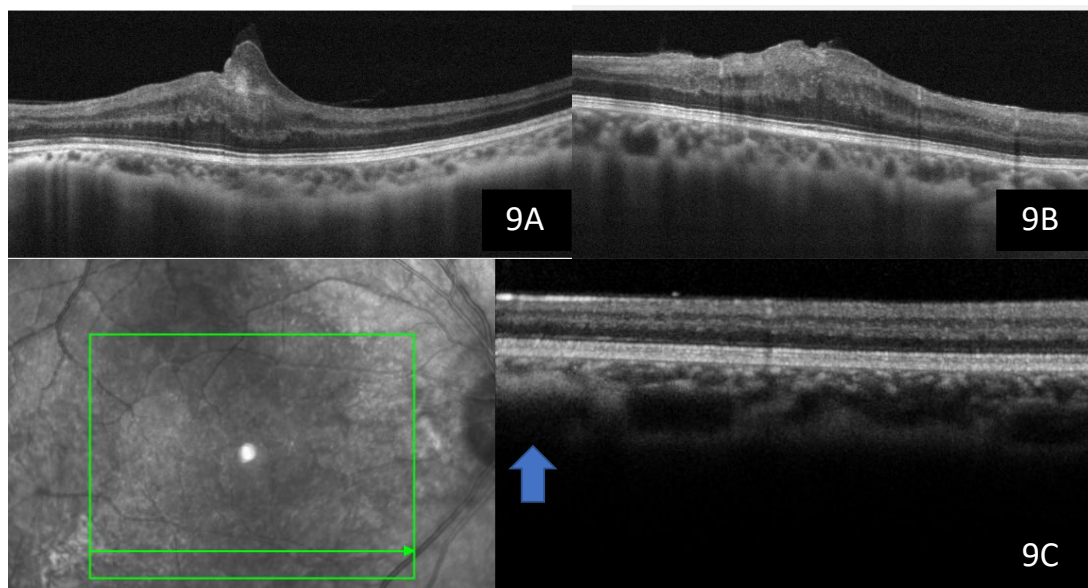


Figura 9. A) SD-OCT do OE mostrando microhamartoma perifoveal. B) Imagem do OE mostrando deformação da região foveal. C) Imagem do OD mostrando nódulo de coroide.

Paciente 8

Paciente do sexo feminino, 15 anos de idade, teve como primeira manifestação da NF2 estrabismo ao nascimento. O diagnóstico foi estabelecido aos 12 anos com base na presença de múltiplos meningiomas e schwannoma vestibular bilateral.

A análise molecular evidenciou heterozigose (uma cópia) no gene NF2 (neurofibromina2, OMIM * 607379). Foi encontrada a variante Chr22: 30.057.260 AACAGACTG>A, que promove a substituição do aminoácido arginina na posição 249 por prolina e, a partir deste

ponto, mudança da matriz de leitura, levando a interrupção prematura da tradução proteica (p.Arg249Profs*9). Esta variante, que leva a perda de função da proteína, está ausente entre cerca de 138 mil indivíduos da população mundial e nunca foi previamente descrita na literatura médica.

Ao exame oftalmológico a acuidade visual foi ausência de percepção luminosa no OD e 20/20 no OE. Apresentava estrabismo paralítico no OD com hipotropia e exotropia fixos. Relatou perda da acuidade visual do OD desde a primeira infância. A biomicroscopia evidenciou presença de catarata subcapsular posterior muito discreta no OD. À fundoscopia observamos presença múltiplas lesões numulares, esbranquiçadas na média periferia de AO e palidez de disco óptico no OD. Devido a localização periférica da maioria das lesões, foi possível realizar SD-OCT apenas em uma lesão equatorial no OE e em uma lesão macular no OE. A SD-OCT revelou tratar-se de microhamartoma de retina macular no OD e pequeno tufo de retina no OE (Figura 10A e 10B). A espessura macular estava aumentada no OD, com uma CMT de 307 μm . Não identificamos descolamento da hialoide posterior. A SD-OCT evidenciou também a presença de nódulo de coroide no OD, semelhante aos descritos em pacientes com NF1 (Figura 10C).

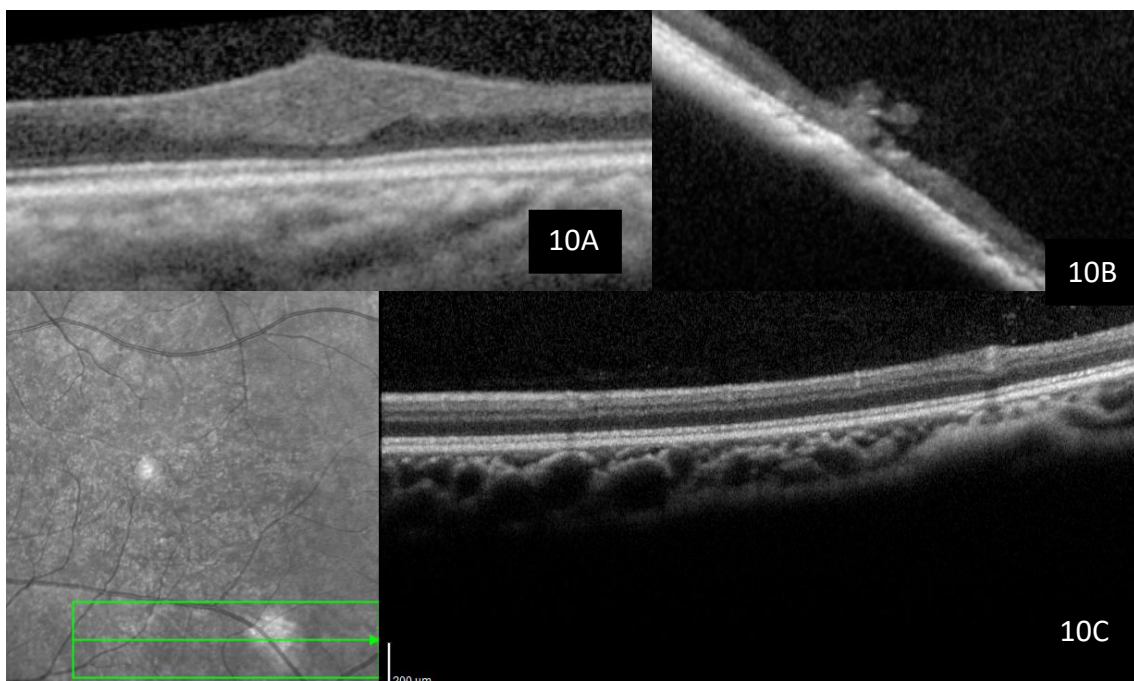


Figura 10. A) SD-OCT do OE mostrando microhamartoma perifoveal. B) Imagem do OE mostrando tufo de retina na região equatorial. C) Imagem do OD mostrando nódulo de coroide.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, está convidado(a) a participar de projeto de pesquisas intitulado: MARCADORES MOLECULARES EM NEUROFIBROMATOSE em uma parceria desenvolvida entre o CENTRO DE REFERÊNCIA EM NEUROFIBROMATOSE DE MINAS GERAIS (CNRF) e o Laboratório de Genética Molecular.

A Neurofibromatose é uma das doenças genéticas mais comuns, apesar da frequência ainda não é muito estudada. O objetivo desse grupo é identificar marcadores ou exames que possam facilitar na condução dos casos e possibilitar maior conhecimento sobre a doença e os doentes.

Ao concordar em participar também de pesquisa, você será incluído dentro do protocolo normal de atendimento do Centro. Não será realizado nenhum exame que não faça parte da rotina de atendimento sem o seu consentimento. Faz parte do Protocolo além do atendimento médico e eventualmente a retirada de nódulos cutâneos para exame histológico, a realização de exame de tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT), a aplicação de testes de desempenho cognitivo e motor assim como a avaliação por outras especialidades médicas de acordo com a sua necessidade. **Embora estas avaliações sejam rotina no processo de atendimento do centro de referência, você poderá se recusar a participar destas avaliações ou retirar seu consentimento em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para você. Toda informação obtida é confidencial.** Os relatórios e resultados deste atendimento poderão ser publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual e apenas dentro do meio acadêmico e científico.

Para maiores informações, você poderá se comunicar com o COEP ou com um dos investigadores responsáveis, pelos telefones (31)34099735 com os Professores Marco-Aurélio Romano ou Débora Miranda ou ainda pode perguntar para o Grupo de profissionais que o (a) atendem no CNRF (Dr. Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues (31 9971 0622)). Sua participação é totalmente voluntária e não será remunerada.

Declaro que li e entendi as informações relativas a este atendimento. Concordo em participar voluntariamente desse projeto.

Nome: _____

Belo Horizonte, ___ de _____ de 20__.

Assinatura do participante ou responsável

Assinatura do entrevistador

**COEP-AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627- UNIDADE ADMINISTRATIVA II- 2º ANDAR,
CAMPUS/PAMPULHA –BH/MG -31270-901- TEL: 31-34994592/ COEP@PRPQ.UFMG.BR**

APÊNDICE B

Termo de consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisas clínicas – NF2.

Você, no momento deste atendimento, está CONVIDADO (A) a participar no projeto de pesquisa em Neurofibromatose do tipo 2, a ser desenvolvido pelo Centro de Referência em Neurofibromatoses do Hospital das Clínicas da UFMG (CRNF) com o seguinte título:

ANÁLISE DA MICROESTRUTURA MACULAR PELA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA NOS PACIENTES COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 2. Concordando ou não em participar desta pesquisa, você continuará recebendo o mesmo atendimento no CRNF.

Ao concordar em participar desta pesquisa, você será incluído no protocolo de alguns exames oftalmológicos, porém não será realizado nenhum exame sem o seu consentimento.

Os exames são os seguintes:

- 1) Exame oftalmológico completo, que inclui medida da acuidade visual de perto e de longe com refração e medida do grau antes e após a dilatação da pupila, avaliação da mobilidade ocular, biomicroscopia, fundo de olho e medida da pressão intraocular.
- 2) Exame na tomografia de coerência óptica: é um exame moderno, não invasivo e muito bem tolerado inclusive por crianças, que mostra detalhes das estruturas do fundo de olho que eventualmente podem não aparecer no exame de fundo de olho usual. O exame na tomografia de coerência óptica não precisa de preparo e pode ser realizado com ou sem dilatação da pupila.
- 3) Em alguns casos pode ser indicada uma foto do fundo de olho para documentação e acompanhamento de alterações encontradas no exame oftalmológico. A foto não é invasiva e também é bem tolerada por crianças.
- 4) Dependendo das alterações oftalmológicas encontrada outros exames oftalmológicos podem ser indicados para melhor avaliação e condução do seu caso. Caso algum exame além da tomografia e da fotografia seja indicado você será novamente consultado e a realização do exame somente será feita após seu consentimento.
- 5) Prescrição de óculos e outros tratamentos oftalmológicos quando necessário.

Você poderá se recusar a participar destas avaliações ou retirar seu consentimento em qualquer momento.

Todas as informações obtidas com os testes realizados são confidenciais, às quais você poderá ter acesso. Os relatórios e resultados deste estudo poderão ser publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual, ou seja, sua identificação não será tornada pública.

Para maiores informações, você poderá se comunicar com a Dra. Vanessa Waisberg pelos telefones (31) 99380580 ou (31) 32266840, Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy pelos telefones (31) 32743355 ou Prof. Dr. Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues, pelos telefones (31) 3491 9460 ou (31) 9971 0622 no horário de 8 às 18 horas, de segunda a sexta-feira, ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais pelo telefone (31) 3409 4592. O Comitê de Ética deve ser contatado somente se houver dúvidas em relação aos aspectos éticos da pesquisa. Serão assinadas duas vias iguais deste termo, uma cópia ficará com você e outra com o pesquisador. O pesquisador também assinará duas vias deste termo.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias seja antes, durante ou após os procedimentos, para maiores informações.

Sua participação é totalmente voluntária e não será remunerada.

Declaro que li e entendi as informações relativas a este atendimento.

Concordo em participar voluntariamente desta pesquisa.

Nome: _____

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20____,

Assinatura do participante ou Responsável

Assinatura do entrevistador

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG): Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar Sala 2005 – CEP 31270-901 – BH – MG –
Telefax: (31) 3409-4592email: coep@prpq.ufmg.br.

APÊNDICE C

Termo de assentimento livre e esclarecido para participação em pesquisas clínicas – NF2.**TERMO DE ASSENTIMENTO**

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (crianças de 5 a 12 anos)

Informação geral: O assentimento informado para a criança/adolescente não substitui a necessidade de consentimento informado dos pais ou guardiães. O assentimento assinado pela criança demonstra a sua cooperação na pesquisa.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa ANÁLISE DA MICROESTRUTURA MACULAR PELA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA NOS PACIENTES COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 2. Seus pais permitiram que você participe.

As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de seis a dezessete anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se você desistir.

A pesquisa será feita no Hospital São Geraldo, onde as crianças e adolescentes farão um exame dos olhos e da visão. O exame é feito com a medida da visão, avaliação da necessidade de óculos e exame dos olhos. Será realizado também um exame do fundo de olho com um aparelho que mostra detalhes da retina, chamado tomografia de coerência óptica. Para os exames de fundo de olho e da tomografia de coerência óptica será preciso pingar duas a três gotas de colírio em cada olho para dilatar a pupila. O exame é seguro, mas você pode sentir algum incômodo pelo ardor momentâneo que o colírio pode causar e pela luz que usamos para examinar os olhos na lâmpada de fenda e no exame de fundo de olho.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos para outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa poderão ser publicados, mas sem identificar as crianças e adolescentes que participaram da pesquisa. Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar para a doutora Vanessa Waisberg pelos telefones (31) 99380580 ou (31) 32266840, para o Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy pelos telefones (31) 32743355 ou para o Prof. Dr. Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues, pelos telefones (31) 3491 9460 ou (31) 9971 0622 no horário de 8 às 18 horas, de segunda a sexta-feira, ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais pelo telefone (31) 3409 4592. O Comitê de Ética deve ser contatado somente se houver dúvidas em relação aos aspectos éticos da pesquisa. Eu e você vamos assinar duas cópias iguais deste termo, uma cópia ficará com você e outra comigo.

Eu _____ aceito participar da pesquisa (ANÁLISE DA MICROESTRUTURA MACULAR PELA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA NOS PACIENTES COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 2). Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que não terá nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura da pesquisadora

Assinatura dos pais/responsável

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG): Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar Sala 2005 – CEP 31270-901 – BH – MG –
Telefax: (31) 3409-4592email: coep@prpq.ufmg.br.

APÊNDICE D

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MICROESTRUTURA MACULAR PELA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA NOS PACIENTES COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 2

Pesquisador: Márcio Bittar Nehemy

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33899114.4.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 819.497

Data da Relatoria: 26/09/2014

Apresentação do Projeto:

Será realizado um estudo transversal, observacional, tipo caso controle por meio da realização de exame oftalmológico e tomografia de coerência óptica nos pacientes com neurofibromatose tipo 2 e seus familiares. Neurofibromatose tipo 2 (NF2) é caracterizada pela presença de schwannomas vestibulares bilaterais e detumores cerebrais (especialmente meningiomas) e medulares. Existem poucos relatos de alterações vítreoretinianas em portadores de NF2 e os autores irão estudar a interface vítreo-retiniana dos pacientes com NF2 usando metodologia atual através da tomografia de coerência óptica de domínio espectral(OCTSD). Serão incluídos os pacientes cadastrados no CRNF-HC que preencherem os critérios para diagnóstico de NF2 e seus parentes de primeiro grau. Serão priorizados os pacientes e familiares que possuem sinais ou sintomas oftalmológicos, neurológicos e auditivos. Os critérios usados para diagnóstico de NF2 no CRNF estão de acordo com a literatura científica atual e são: 1) schwannoma vestibular bilateral; 2) parente de primeiro grau com NF2 e schwannoma vestibular unilateral ou dois dos seguintes achados: meningioma, schwannoma glioma, neurofibroma, catarata juvenil; 3) meningiomas múltiplos e schwannoma vestibular unilateral; 4) schwannoma unilateral e dois dos seguintes achados: meningioma, schwannoma, glioma, neurofibroma, catarata juvenil. Serão selecionados trinta e seis indivíduos saudáveis, com exame oftalmológico

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 819.497

normal, acuidade visual de 20/20 em ambos os olhos e erro refracional entre +6,00 e -6,00 dioptrias, pareados por sexo e idade para compor o grupo controle. O exame oftalmológico será composto por medida da acuidade visual com e sem correção, antes e após ciclopegia; biomicroscopia na lâmpada de fenda antes e após midríase; exame do fundo de olho com biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta e tonometria de aplanção. A classificação da catarata será feita de acordo com o sistema LOCS III (Lens Opacities Classification System III). Os achados do exame oftalmológico serão detalhadamente descritos. O exame com a tomografia de coerência óptica de domínio espectral (Heidelberg, Engineering, Alemanha) será realizado no mesmo dia do exame oftalmológico. Serão realizados cortes transversais e longitudinais na região macular, disco óptico e região equatorial. Serão feitas ainda imagens com filtros de infra-vermelho e autofluorescência, além de cortes de tomografia óptica com EDI (enhanced depth image) e análise da camada de fibras nervosas da retina. As alterações oftalmológicas serão documentadas com retinografia colorida e nos casos que tiverem indicação clínica serão realizados outros exames complementares como, por exemplo, angiografia fluorescente. Os achados tomográficos oculares de cada família serão comparados e analisados entre si e com outras famílias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: estabelecer quais são as alterações da interface vítreo-retinianas encontradas nos pacientes com NF2 e sua correlação com a presença de membrana epirretiniana nestes pacientes através da OCT-SD.

Objetivo Secundário: avaliar a prevalência de membrana epirretiniana e outras lesões corio-retinianas nestes doentes, através da OCT-SD. Avaliar a anatomia do segmento posterior do olho dos pacientes com NF2, incluído análise do disco óptico, retina e coróide, através da OCT-SD.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O exame oftalmológico estruturado para a pesquisa não implica em riscos ou danos físicos. A tomografia de coerência óptica e a retinografia colorida não envolvem riscos para os pacientes.

Benefícios: Nos casos em que o diagnóstico venha a ser feito em pacientes assintomáticos e que não estavam buscando atendimento há que se considerar dois aspectos: 1) O diagnóstico pode beneficiar o paciente, a longo prazo, uma vez que passará a ser acompanhado por especialistas. 2) O paciente terá opção de ser acompanhado no CRNF-HC. 3) O paciente que não estiver buscando o diagnóstico terá a opção de não saber dos resultados da pesquisa. Esta opção será oferecida no termo de consentimento livre e esclarecido. A realização dos exames propostos nos voluntários que vierem a ser incluídos no presente estudo está respaldada pelas normas propostas pela

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 819.497

Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo esta norma, os médicos devem solicitar testes para dada doença somente se: 1) for um problema grave de saúde. 2) Os médicos puderem reconhecer um estágio latente e sintomas precoces. 3) Os pacientes tiverem acesso a serviços de diagnóstico e tratamento, entre outros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa importante na área de Oftalmologia e poderá trazer benefícios para os seus participantes. O projeto está bem delineado com metodologia adequadamente estruturada. O Instituto da Visão - Hospital de Olhos é coparticipante.

O CRNF-HC possui em seus registros 18 pacientes com NF2, dos quais boa parte pode ser contatada. A maioria deles possui familiares de primeiro grau vivos.

As solicitações do COEP foram atendidas:

1. O pesquisador esclarece que serão avaliados os portadores de NF2 cadastrados no Centro de Referência de Neurofibromatoses do HC e seus parentes de primeiro grau. Os pacientes com NF2 atualmente cadastrados têm idade entre doze e sessenta anos. Os filhos dos portadores de NF2 que tiverem idade entre cinco anos e trinta anos serão convidados a participar da pesquisa. Poderão ser incluídos pacientes menores de idade com idade entre cinco anos e dezoito anos incompletos. Foram elaborados e anexados Termos de Assentimento livre e esclarecido de acordo com a idade dos participantes (TALE para crianças de 5 a 11 anos e TALE para adolescentes de 12 a 18 anos). Os TALEs foram criados em linguagem acessível às crianças e aos adolescentes.

2. Foram explicitados os riscos da pesquisa: os exames oftalmológicos elaborados para a pesquisa são seguros e não envolvem riscos significativos para os pacientes. A midríase farmacológica será feita com duas a três gotas de colírio tropicamida. A tropicamida tópica é segura e pode ser usada inclusive em recém-nascidos. Em pacientes predisponentes, a midríase farmacológica pode, em alguns casos, precipitar uma crise de glaucoma agudo. Todos os pacientes serão examinados antes da midríase e se for identificado algum fator de risco para glaucoma agudo (por exemplo, câmara anterior rasa), não será realizada a midríase farmacológica. O exame de tomografia de coerência óptica pode ser realizado mesmo sem dilatação da pupila. O colírio de tropicamida pode causar ardor ocular momentâneo, que melhora poucos segundos após sua instilação. O exame oftalmológico também pode causar desconforto momentâneo nos pacientes mais sensíveis à luz.

3. Informou-se no TCLE e no TALE que o Comitê de Ética deve ser contactado somente se houver dúvidas em relação aos aspectos éticos da pesquisa e incluiu-se que o participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma com o participante e outra com o

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005**Bairro:** Unidade Administrativa II**CEP:** 31.270-901**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3409-4592**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 819.497

pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória que foram adequadamente apresentados:

1. Folha de rosto assinada pelo diretor da Faculdade de Medicina
2. Projeto de pesquisa original
3. Parecer consubstanciado favorável pela Câmara Departamento da Oftalmologia
4. Registro na DEPE
5. Anuência de todos os setores do HC-UFGM envolvidos na pesquisa
6. TCLE em forma de convite e em linguagem acessível.
7. TALE para crianças de 5 a 11 anos
8. TALE para adolescentes de 12 a 18 anos.

Recomendações:

O COEP sugere que o TALE para crianças de 5 a 11 anos seja transformado em TALE para crianças de 6 a 11 anos, pois o assentimento da criança deve ser obtido se a partir do momento em que ela estiver alfabetizada. Se ela ainda não for alfabetizada, prevalece o TCLE para pais/responsáveis, sem prejuízo da informação e do assentimento da criança.

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à aprovação do projeto "ANÁLISE DA MICROESTRUTURA MACULAR PELA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA NOS PACIENTES COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 2" do Pesquisador Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 819.497

BELO HORIZONTE, 06 de Outubro de 2014

Assinado por:
Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

