

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Tese de Doutorado

**Identificação de marcadores moleculares de transformação
maligna dos neurofibromas plexiformes em pacientes com
neurofibromatose tipo 1**

Autora: Cinthia Vila Nova Santana

Orientador: Prof. Dr. Renan Pedra de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte – MG

2018

Cinthia Vila Nova Santana

Identificação de marcadores moleculares de transformação maligna dos neurofibromas plexiformes em pacientes com neurofibromatose tipo 1

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética junto ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Renan Pedra de Souza e co-orientação da Prof^a Dr^a Débora Marques de Miranda.

Belo Horizonte – MG

2018

043 Santana, Cinthia Vila Nova.
Identificação de marcadores moleculares de transformação maligna dos neurofibromas plexiformes em pacientes com neurofibromatose tipo 1 [manuscrito] / Cinthia Vila Nova Santana. – 2018.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Renan Pedra de Souza. Co-orientadora: Prof^a Dr^a Débora Marques de Miranda..

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Neurofibromatose 1. 3. Neurofibroma Plexiforme. 4. Polimorfismo (Genética). 5. MicroRNAs. 6. Telômero. I. Souza, Renan Pedra de. II. Miranda, Débora Marques de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575

Ficha elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Renan Pedra de Souza, pela confiança e conhecimento compartilhado e por me trazer calma nos momentos de caos. À minha co-orientadora, Débora Miranda, pela inspiração e por me receber novamente tão bem em seu laboratório.

Ao meu orientador no exterior, John Vincent, e seu grupo de pesquisa por todo o aprendizado pessoal e profissional que fizeram do período em Toronto muito especial.

Ao Dr. Luiz Oswaldo, por ser exemplo de conduta médica e por lembrar sempre que as pesquisas são feitas em prol dos pacientes.

A meus pais, Emerson e Nádia, e meus irmãos, Brenda e Vinni, por todo o apoio e confiança em mim depositados. Aos meus tios, Emílio e Lívia, inspirações pela busca incessante do conhecimento.

Aos amigos que deixaram os dias mais leves durante essa longa caminhada. Em especial a Taynná, Patrícia, Érika, Antônio, Thayana, Flávia, João, Caio, Ana Paula, Eduardo, Gesiane, Nathália, Joice, Magno, Hèlia, Daniela, Ilanna e Gustavo. E aos amigos de longa data que também participaram deste processo: Natayme, Jamille, Patrícia, Gustavo, Jhonny, Edinho, Isadora, Sammuel e Gian.

A todos que estiveram presentes durante a execução deste trabalho, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“A ciência não tem sentido senão quando serve aos
interesses da humanidade”

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da sinalização da RAS e as alterações moleculares das RASopatias...	16
Figura 2: Papel da neurofibromina na via RAS-MAPK.	18
Figura 3: Manifestações clínicas mais comuns na NF1.....	21
Figura 4: Idade do aparecimento dos principais sinais e sintomas da NF1.	21
Figura 5: Sinal do Segundo Dedo dos Pés (SSDP).	22
Figura 6: Organização do nervo normal e do neurofibroma.	23
Figura 7: Telômero e telomerase.	26
Figura 8: Problema de replicação final.	27
Figura 9: Replicação dos telômeros pela telomerase.....	29
Figura 10: Biogênese e funcionamento dos miRNAs.	33
Figura 11: Resultado ilustrativo da MLPA obtido através do software GeneMarker.	41
Figura 12: Esquema ilustrativo do mecanismo da genotipagem através do ensaio TaqMan® SNP Genotyping	44
Figura 13: Dendograma de proximidade das características clínicas em NF1.	50
Figura 14: Diagrama ilustrativo correspondente ao número de indivíduos com NF1 em cada processo laboratorial.....	51
Figura 15: Análise do comprimento relativo dos telômeros.	54
Figura 16: Análise de correspondência para o rs10069690 de <i>TERT</i>	59
Figura 17: Distribuição dos valores de p para os haplótipos de <i>TERT</i> de acordo com o perfil tumoral em NF1.	63
Figura 18: Representação da estratégia de pesquisa utilizada para a revisão sistemática. .	65
Figura 19: Rede de interações dos principais processos biológicos identificados.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Idade do aparecimento e frequência dos principais sinais e sintomas da NF1	22
Tabela 2: Localização cromossômica, gênica, polimorfismo e sequência das sondas utilizadas neste trabalho.....	46
Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes com NF1.....	49
Tabela 4: Características clínicas dos indivíduos que apresentaram deleção na MLPA.	52
Tabela 5: EHW e MAF para os SNPs estudados.....	55
Tabela 6: Desequilíbrio de ligação entre os SNPs avaliados neste trabalho.....	55
Tabela 7: Distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos de <i>TERT</i>	55
Tabela 8: Haplótipos para os polimorfismos de <i>TERT</i> para casos e controles.....	56
Tabela 9: Modelos genéticos para o perfil de malignização em indivíduos com MPNST e PNF (assintomático e sintomático) para os SNPs de <i>TERT</i>	58
Tabela 10: Comprimento relativo dos telômeros de acordo com os genótipos para os polimorfismos no gene <i>TERT</i> em NF1.....	60
Tabela 11: Modelos genéticos para o perfil de malignização em indivíduos com MPNST e PNF (assintomático e sintomático) para os SNPs de <i>TNF-α</i> e <i>AKT1</i>	61
Tabela 12: Haplótipos para os polimorfismos de <i>TERT</i> e <i>AKT1</i> de acordo com perfil do tumor plexiforme em pacientes com NF1.....	62
Tabela 13: Modelo poligênico.....	63
Tabela 14: Lista de miRNAs com níveis expressão diminuídos em MPNSTs.....	66
Tabela 15: Lista de miRNAs com níveis expressão aumentados em MPNSTs.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores utilizados para reação de qPCR.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO: proteína Argonauta
AIC: critério de informação de Akaike
ALPS: síndrome linfoproliferativa autoimune
AKT1: serina/treonina quinase 1
BRCA1: gene do câncer de mama 1 (*breast cancer gene 1*)
CDKN2A: Inibidor de ciclina dependente de quinase (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*)
CFC: síndrome Cardio-Facial-Cutânea
CM-AVM: síndrome da malformação capilar e arteriovenosa
cNF: neurofibroma cutâneo
CREBBP: gene da proteína de ligação a CREB
CRNF: Centro de Referência em Neurofibromatose de Minas Gerais
Ct: *cycle thresholds*
CTMM: Centro de Tecnologia em Medicina Molecular
DGCR8: região crítica do gene 8 na síndrome DiGeorge (*DiGeorge syndrome critical region gene-8*)
DKC: disquerina
EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg
GDP: guanosina difosfato
GL: graus de liberdade
GO: Gene Ontology
GRB2: do inglês, *growth factor receptor bound 2*
GTP: guanosina trifosfato
IC: intervalo de confiança
LD: desequilíbrio de ligação
MAF: frequência do alelo menos frequente
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MCL: mancha café com leite
MEK: MAPK-ERK quinase
MLPA: amplificação de sondas dependente de ligação (*multiplex ligation-dependent probe amplification*)
MPNSTs: tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (*malignant peripheral nerve sheath tumour*)
mRNA: RNA mensageiro

miRNA: microRNA
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
ncRNAs: RNAs não codificantes
NF: neurofibromatose
NHP2: *non-histone protein 2*
NIH: *National Institutes of Health*
NOP10: proteína nucleolar 10
P-bodies: corpos de processamento
PET-CT: tomografia por emissão de pósitron e tomografia computadorizada
POT1: proteção dos telômeros 1
PNF: neurofibroma plexiforme
pre-miRNAs: miRNAs precursores
pri-miRNAs: miRNAs primários
PRISMA: *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-analysis*
qPCR: reação da polimerase em cadeia quantitativa
qRT-PCR: RT-PCR quantitativa em tempo real
RAF: *murine sarcoma viral oncogene homologue*
RAP1: proteína repressora/ ativadora 1
RAS: proteína vírus do sarcoma de rato (*rat sarcoma virus*)
RC: razão de chances
RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA
RPLP0: fosfoproteína ácida ribossomal PO
RTK: receptor de tirosina quinase
scNF: neurofibroma subcutâneo
SHC: *Src homology 2 domain containing*
SHP2: *Src-homology protein 2*
SNP: polimorfismo de base única
SOS1: *mammalian homolog of the Drosophila son of sevenless 1*
SSDP: Sinal do Segundo Dedo dos Pés
STAT3: proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3
SUV_{max}: valor de captação padronizado máximo
TCAB1: proteína telomerase dos corpos de Cajal 1
TERT: transcriptase reversa da telomerase
TERC: componente molde de RNA da telomerase
TIN2: fator de interação nuclear com TRF1 2

TMBNP: tumor maligno da bainha do nervo periférico

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TR: RNA da telomerase

TRBP: *transactivation responsive element RNA binding-protein*

TRF: fator de ligação à repetição telomérica

TRPS1: transcriptional repressor GATA binding 1 gene

UTR: região não traduzida

X²: qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Neurofibromatose tipo 1.....	15
1.1.1. Caracterização molecular da NF1	17
1.1.2. Caracterização clínica da NF1	19
1.2. Marcadores moleculares.....	25
1.2.1. Telômeros.....	25
1.2.2. MicroRNAs.....	30
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. METODOLOGIA	38
4.1. Recrutamento e avaliação de pacientes	38
4.2. Coleta e processamento da amostra biológica.....	39
4.3. Amplificação de sondas dependente de ligação (MLPA)	40
4.4. Determinação do comprimento relativo dos telômeros.....	41
4.5. Genotipagem por PCR em tempo real	43
4.6. Revisão sistemática e análise <i>in silico</i> dos miRNAs na NF1	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Caracterização da amostra	48
5.2. Análise da MLPA	51
5.3. Indivíduos com NF1 apresentam maior comprimento relativo dos telômeros.....	53
5.4. Análise dos polimorfismos para <i>TERT</i> , <i>TNF-α</i> e <i>AKT1</i>	54
5.5. Revisão sistemática e análise <i>in silico</i> de miRNAs encontrados na NF1...	64
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9. APÊNDICES	93
9.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93

9.2.	Principais processos biológicos identificados a partir da interação dos miRNAs listados nas Tabelas 14 e 15.....	95
9.3.	Nuvem de palavras dos principais processos relacionados aos miRNAs em NF1.....	96
10.	ANEXOS.....	97
10.1.	Anexo 1: Protocolo de atendimento do CRNF.....	97

RESUMO

Introdução: A neurofibromatose tipo 1 (NF1) tem como uma das principais características a presença de manchas café com leite (MCL), falsas efélides axilares ou inguinais e neurofibromas. Os neurofibromas plexiformes (PNFs) são tumores inicialmente benignos, que apresentam uma chance de malignização para os tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (TMBNPs). Atualmente, ainda não existem marcadores moleculares específicos adequados que possam prever o processo de malignização do tumor plexiforme.

Objetivo: Identificar marcadores moleculares que auxiliem na identificação precoce da malignização dos PNFs.

Metodologia: Foram realizadas as técnicas de MLPA (n=48 NF1), comprimento relativo do telômero (n=49 controles e n=49 NF1), genotipagem de polimorfismos para *TERT* (rs10069690, rs2853660 e rs2736100) (n=79 controles e n=95 NF1), *TNF- α* (rs1800669) (n=58 NF1) e *AKT1* (rs1130214 e rs3803304) (n=58 NF1). Foi realizada ainda revisão sistemática e análise *in silico* dos microRNAs descritos na literatura para NF1.

Resultados: A MLPA detectou deleções em 14,58% dos pacientes. Indivíduos com NF1 mostraram telômeros mais alongados que os controles, mas não houve diferença entre os subgrupos da NF1 (PNF assintomático, PNF sintomático e TMBNP). Apenas o rs10069690 de *TERT* apresentou associação significativa com a malignização do tumor plexiforme (RC=10,33 para presença do alelo T). 75 microRNAs foram identificados, dos quais oito foram mais frequentes (miR-210, miR-10b, miR-130b, miR-137, miR-214, miR-146a, miR-150, miR-195). As principais vias biológicas envolvidas na patogênese da NF1 identificadas foram: sinalização célula-célula, diferenciação celular, transporte transmembrana, metabolismo lipídico, regulação da transcrição e pós-transcrição, modificação proteica pós-traducional, modificação de histonas, ativação da via MAPK, apoptose e regulação da neurogênese, angiogênese e crescimento.

Conclusão: MLPA e comprimento relativo de telômeros não mostraram evidências suficientes para diferenciar os estágios do tumor plexiforme em NF1, ao passo que o polimorfismo rs10069690 parece contribuir para esse processo. Os microRNAs, apesar de bastante heterogêneos, apresentam grande potencial como biomarcadores nesta doença.

Palavras-chave: neurofibromatose tipo 1, neurofibroma plexiforme, TMBNP, telômero, polimorfismo, microRNA.

ABSTRACT

Introduction: The main characteristics of Neurofibromatosis type 1 (NF1) are café-au-lait spots (CAL), axillary or inguinal freckling and neurofibromas. Plexiform neurofibromas (PNFs) are initially benign tumors, which can transform into malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). Currently, there are no specific molecular markers that can predict the malignant process of the plexiform tumor.

Objective: To identify molecular markers that help in the early identification of MPNST.

Methods: MLPA (n = 48 NF1), relative telomere length (n = 49 controls, n = 49 NF1), genotyping of *TERT* (rs10069690, rs2853660 and rs2736100) (n = 79 controls, n = 95 NF1), *TNF- α* (rs1800669) (n = 58 NF1) and *AKT1* (rs1130214 and rs3803304) (n = 58 NF1) polymorphisms. Systematic review and in silico analysis of microRNAs described in the literature for NF1 were also performed.

Results: The MLPA detected deletions in 14.58% of the patients. NF1 subjects showed longer telomeres than controls, but no difference was seen between NF1 subgroups (asymptomatic PNF, symptomatic PNF and MPNST). Only rs10069690 (*TERT*) presented a significant association with malignancy of the plexiform tumor (OR = 10.33 for the presence of allele T). 75 microRNAs were identified, of which eight were more frequent (miR-210, miR-10b, miR-130b, miR-137, miR-214, miR-146a, miR-150, miR-195). The main biological pathways involved in the pathogenesis of NF1 identified were: cell-cell signaling, cell differentiation, transmembrane transport, lipid metabolism, transcription regulation and post-transcription, posttranslational protein modification, histone modification, MAPK pathway activation, apoptosis and regulation of neurogenesis, angiogenesis, and growth.

Conclusion: MLPA and relative telomere length did not show sufficient evidence to differentiate the stages of the plexiform tumor in NF1, whereas the polymorphism rs10069690 seems to contribute in this process. MicroRNAs, although quite heterogeneous, present a potential as biomarkers in this disease.

Key words: neurofibromatosis type 1, plexiform neurofibroma, MPNST, telomere, polymorphism, microRNA.

1. INTRODUÇÃO

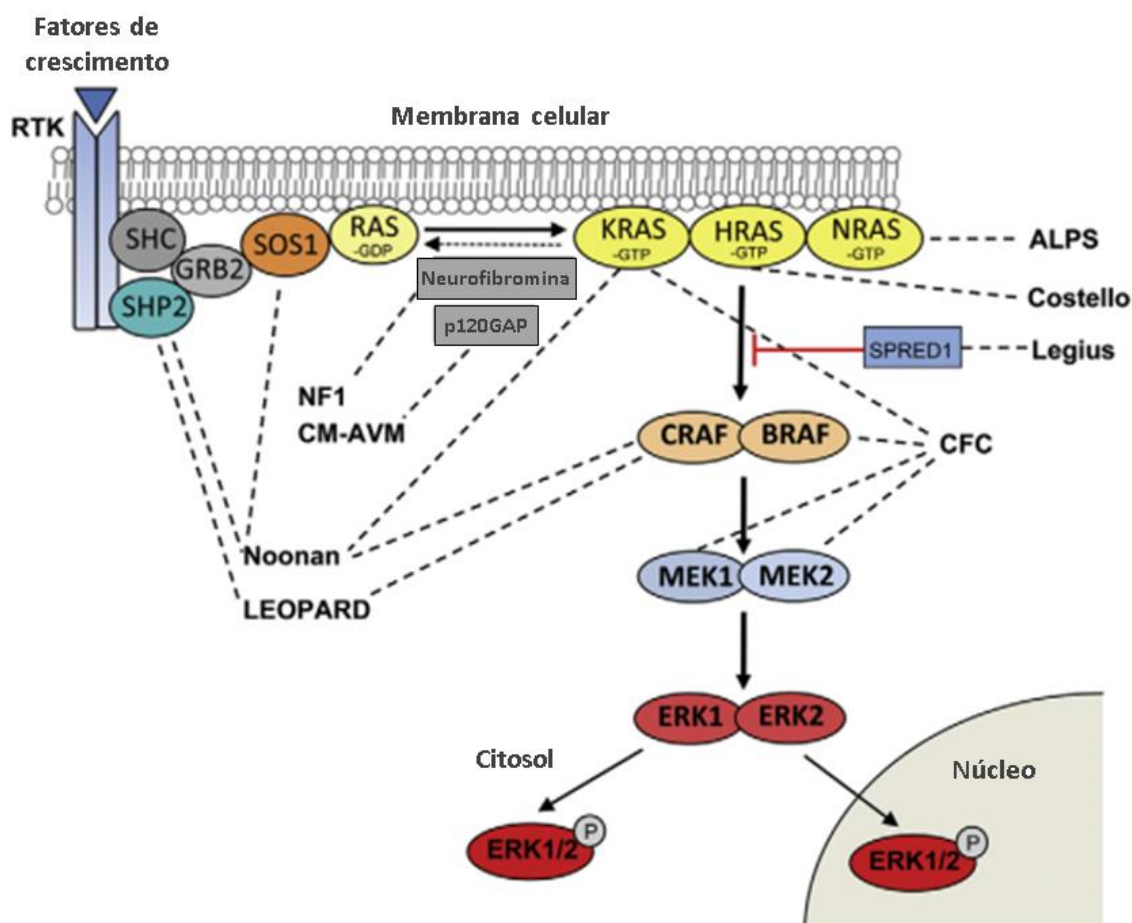
1.1. Neurofibromatose tipo 1

O termo neurofibromatose é uma denominação genérica que designa três doenças autossômicas dominantes, que causam crescimento de tumores nos tecidos nervosos e outros tecidos como a pele e ossos (SOUZA, 2013). São elas: neurofibromatose tipo 1 (NF1), neurofibromatose tipo 2 (NF2) e schwannomatose. Destas, a NF1 é a condição genética mais frequente predisponente ao aparecimento de tumores afetando, aproximadamente, 1 em cada 3000 nascimentos (BREMS et al., 2009; FRIEDMAN, 1999), frequência superior a doenças como fibrose cística (1:10.000) ou o diabetes mellitus tipo 1 (1:13.000). A NF2 e a schwannomatose são mais raras, acometendo cerca de 1:25.000 e 1:40.000 nascidos vivos, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2009; UHLMANN; PLOTKIN, 2012). Apesar de estarem dentro do mesmo grupo das neurofibromatoses, essas doenças apresentam características clínicas e genéticas bem distintas (GUTMANN et al., 2017).

A NF1 faz parte de um conjunto de síndromes genéticas humanas denominadas RASopatias (Figura 1). Estas síndromes são causadas por mutações em genes que codificam componentes da via de sinalização RAS-MAPK, que apresenta papel essencial no controle do ciclo celular, diferenciação, apoptose e senescência (RAUEN, 2013).

A ativação desta via se dá a partir da ligação de fatores de crescimento em receptores tirosina quinase (RTK), que recrutam uma série de proteínas (SHC, SHP2, GRB2, SOS1). A proteína GRB2 forma então um complexo proteico com SOS1, que, por sua vez, estimulará a fosforilação de RAS-GDP para RAS-GTP, culminando na ativação da via RAS (KRAS, HRAS ou NRAS). RAS-GTP ativa RAF, levando à ativação da via MEK/ERK, que apresenta diversos alvos, tanto citoplasmáticos como nucleares (BREMS et al., 2009; DOWNWARD, 2003). A via RAS-MAPK é extensamente estudada no contexto da oncogênese, uma vez que mutações na mesma são uma das causas primárias de diversos tipos de câncer (TIDYMAN; RAUEN, 2009). Estudos sugerem que cerca de 30% dos cânceres humanos apresentam mutações nesta via (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011; FORBES et al., 2011).

Figura 1: Esquema da sinalização da RAS e as alterações moleculares das RASopatias.



Fonte: Figura adaptada de TIDYMAN; RAUEN, 2009.

Legenda: Mutações na via RAS são responsáveis por uma série de doenças (representadas pelas linhas pontilhadas) tais como neurofibromatose tipo 1 (NF1), síndrome da malformação capilar e arteriovenosa (CM-AVM), síndrome de Noonan, síndrome LEOPARD, síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), síndrome de Costello, síndrome de Legius e síndrome Cardio-Facial-Cutânea (CFC). RTK: receptor de tirosina quinase, SHC: *Src homology 2 domain containing*, SHP2: *Src-homology protein 2*, GRB2: *growth factor receptor bound 2*, SOS1: *mammalian homolog of the Drosophila son of sevenless*, RAS: *rat sarcoma viral oncogene homologue*, GDP: guanossina difosfato, GTP: guanossina trifosfato, RAF: *murine sarcoma viral oncogene homologue*, MEK: *MAPK-ERK kinase*.

Inicialmente descrita em 1882 pelo patologista alemão Von Recklinghausen (REYNOLDS et al., 2003), a NF1 apresenta alto grau de variabilidade da expressão clínica e prognóstico, mesmo nos casos intrafamiliares (EASTON et al., 1993; JETT; FRIEDMAN, 2010). Se por um lado uma pequena parcela dos indivíduos afetados pela NF1 nunca chegam a manifestar os tumores conhecidos como neurofibromas, por outro lado, sabe-se que as neoplasias malignas constituem 55% das causas de morte em indivíduos com diagnóstico de

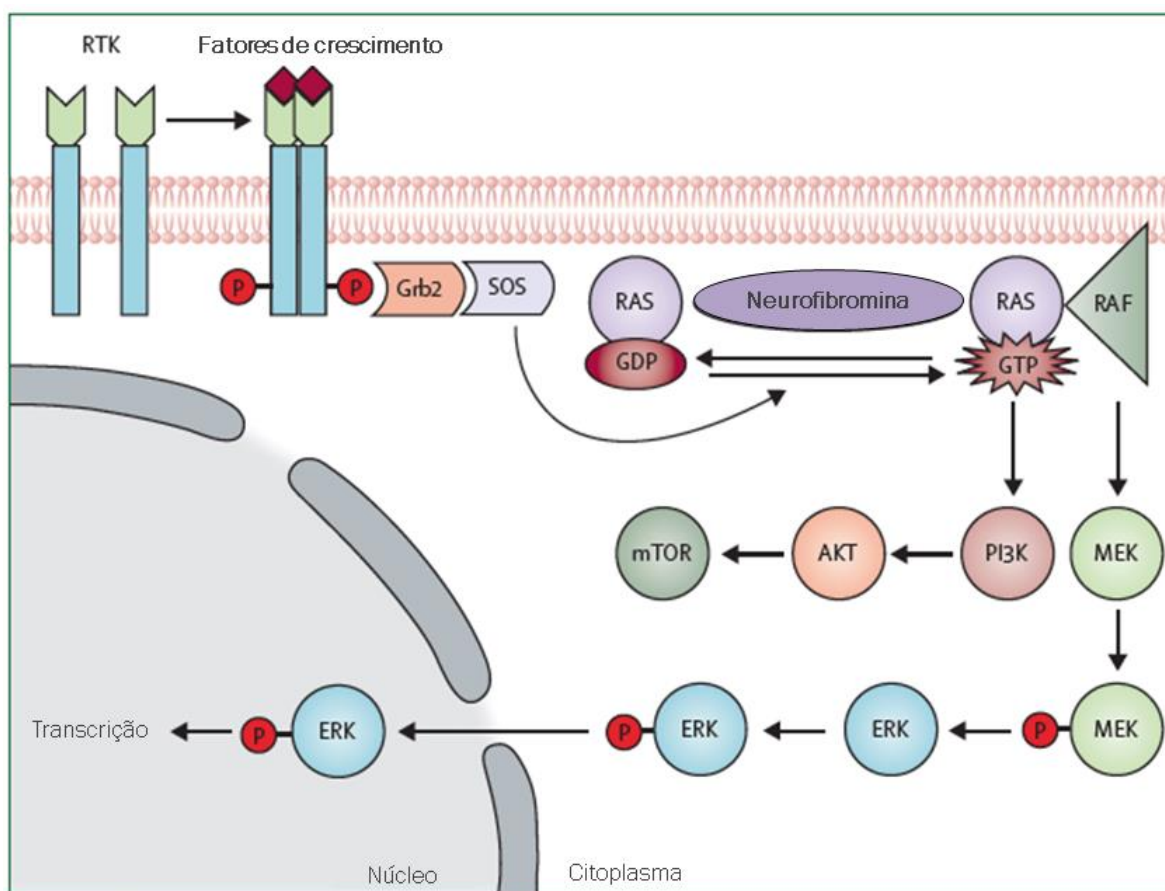
NF1 sendo que os tumores mais frequentemente encontrados são os cerebrais e os de tecidos moles e conectivos (BREMS et al., 2009). Os mecanismos associados à variabilidade clínica permanecem desconhecidos, provavelmente devido a sua complexa fisiopatologia (SABBAGH et al., 2013), e, embora tamanha heterogeneidade seja vista, estudos prévios identificaram uma redução de, pelo menos, 15 anos na expectativa de vida entre pacientes com NF1, quando comparados à população geral (MASOCCO et al., 2011; RASMUSSEN; YANG; FRIEDMAN, 2001).

1.1.1. Caracterização molecular da NF1

A NF1 é herdada de forma autossômica dominante com penetrância completa e acomete igualmente ambos os sexos. Em cerca de 50% dos casos, os pacientes não apresentam história familiar de NF1 sugerindo alta incidência mutações *de novo* (FRIEDMAN, 1999; SABBAGH et al., 2013).

O gene *NF1*, isolado em 1990, está localizado no cromossomo 17q11.2, abrange 60 éxons (57 constitutivos e 3 de splicing alternativo) (CAWTHON et al., 1990; PASMANT et al., 2015), e se estende por aproximadamente 350 kb de DNA genômico. Ele codifica uma proteína chamada neurofibromina, com cerca de 327 kDa e 2.818 aminoácidos, a qual está presente em quase todos os tecidos do corpo, mas principalmente no cérebro, medula espinhal e nervos periféricos (NORDLUND et al., 1993; UPADHYAYA et al., 2007). A neurofibromina apresenta papel relevante na supressão do crescimento tumoral, através da inativação da via RAS-MAPK, promovendo a hidrólise da forma ativa RAS-GTP para sua forma inativa, RAS-GDP (Figura 2) (BREMS et al., 2009; RATNER; MILLER, 2015). A inativação deste gene, através de mutação ou perda alélica, culmina na perda de função da neurofibromina e subsequente desenvolvimento de diversos tipos de tumores vistos na doença (REYNOLDS et al., 2003; YAP et al., 2014).

Figura 2: Papel da neurofibromina na via RAS-MAPK.



Fonte: Figura adaptada de BREMS *et al.*, 2009.

Legenda: A neurofibromina age como reguladora negativa da via de RAS, fazendo com que a sua forma ativa RAS-GTP passe para a forma inativa, RAS-GDP. Mutações no gene da neurofibromina levam a uma constante ativação de RAS, que por sua vez, ativa RAF e, conseqüentemente, a via MEK/ERK, que apresenta diversos alvos. RAS-GTP pode ainda ativar PI3K, AKT e mTOR. RTK: receptor de tirosina quinase, P: fosforilação, PI3K: *phosphatidylinositol-3-kinase*, AKT: serina/treonina quinase 1, mTOR: *mammalian target of rapamycin*.

De acordo com o banco de dados *Human Gene Mutation Database*, existem mais de 2.000 mutações descritas no locus *NF1* (ver endereço eletrônico <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NF1>, acessado em 10 de março de 2018). Diferentes mecanismos de mutações foram observados, incluindo substituição de nucleotídeos, deleções, inserções e, até mesmo, alterações cromossômicas estruturais (SABBAGH *et al.*, 2013). A grande maioria das mutações são intragênicas (mais de 90% dos casos) e há, ainda, um pequeno número de grandes deleções na região 17q11 que estão relacionadas à *NF1*. Estas deleções podem não somente afetar o *NF1*, mas também genes vizinhos devido a sua extensão, tais como o gene da proteína supressora tumoral p53

(17p13.2), o *STAT3* (proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3) (17q21.2) e o *BRCA1* (gene do câncer de mama 1) (17q21.2) (JETT; FRIEDMAN, 2010; REINHOLZ et al., 2009; YAP et al., 2014).

Diversos estudos já tentaram avaliar se havia um componente genético associado à variabilidade clínica da NF1 em grandes coortes (EASTON et al., 1993; SABBAGH et al., 2009; SZUDEK; JOE; FRIEDMAN, 2002), entretanto ainda não foi possível estabelecer uma relação genótipo-fenótipo para a NF1, com exceção das seguintes situações:

(1) uma deleção *inframe* de três pares de bases no éxon 17 (c.2970-2972 delAAT) que está associada a ausência de neurofibromas cutâneos, a chamada neurofibromatose espinhal (UPADHYAYA et al., 2007);

(2) cerca de 5% a 10% das mutações descritas são grandes deleções que estão associadas a uma apresentação clínica atípica e mais grave também conhecida como síndrome de microdeleções da NF1 (PASMANT et al., 2010);

(3) e, mais recentemente, foi sugerida uma associação mais rara (1-2% dos pacientes) com a presença de manchas café com leite (com ou sem falsas efélides) e nódulos de Lisch, maior incidência de estenose pulmonar e baixa estatura (o que caracteriza um fenótipo de NF-Noonan) em indivíduos com mutação *missense* no códon 1809 (p.Arg1809) do éxon 29 (ROJNUEANGNIT et al., 2015).

Há ainda mais um trabalho que sugere correlação genótipo-fenótipo para uma maior incidência de mutações não truncadas (*missense*, quando há troca de aminoácido, e deleções *inframe*) em pacientes com NF1 que apresentaram estenose pulmonar (BEN-SHACHAR et al., 2013).

A análise das mutações no gene da neurofibromina geralmente não é realizada no contexto diagnóstico devido à imensa heterogeneidade molecular já descrita, além do grande tamanho do gene e da ausência de *hotspots* de mutação (ARS et al., 2003; SABBAGH et al., 2013). Portanto, para o diagnóstico da NF1, atualmente, são utilizados os critérios clínicos, abordados em seguida.

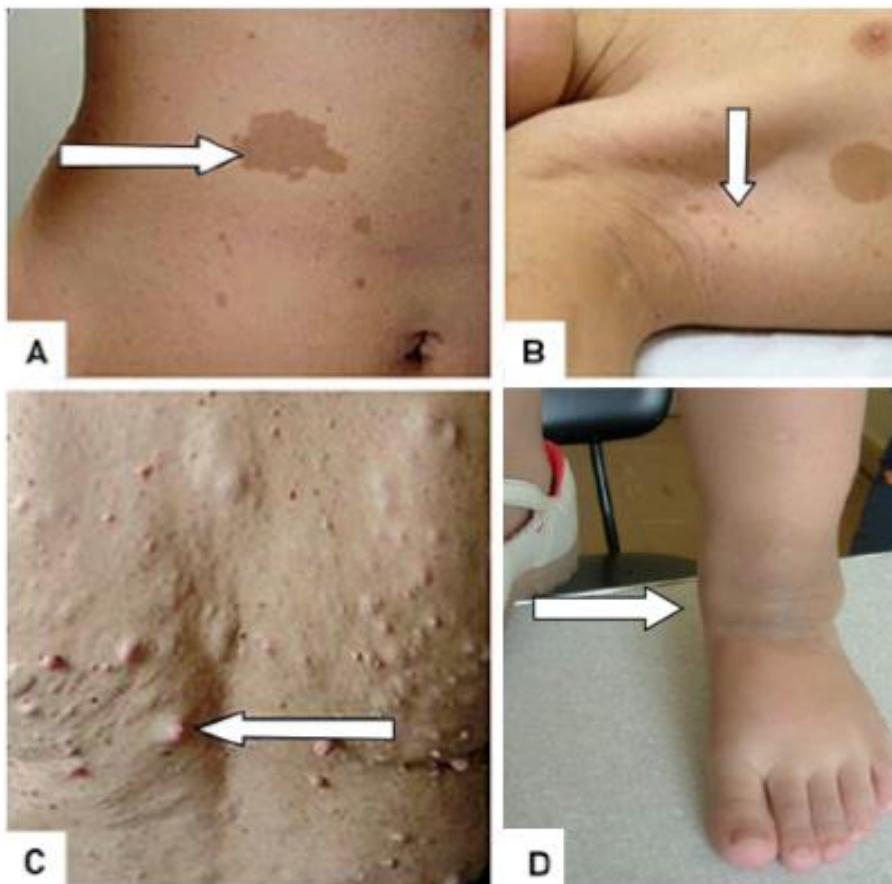
1.1.2. Caracterização clínica da NF1

O critério diagnóstico para NF1 foi estabelecido em 1988 pelo *National Institutes of Health* (NIH, 1988), no qual um indivíduo é diagnosticado com a doença se apresentar duas ou mais das seguintes características:

1. seis ou mais manchas café-com-leite com diâmetro > 5 mm em indivíduos pré-púberes, ou > 15 mm em pós-púberes;
2. dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um neurofibroma plexiforme, baseado em parâmetros clínicos e histológicos;
3. falsas efélides (sardas) em região axilar ou inguinal;
4. glioma óptico;
5. dois ou mais nódulos de Lisch (hamartomas pigmentados da íris);
6. uma lesão óssea distinta como pseudoartrose de um osso longo ou displasia da asa do esfenóide;
7. um parente em primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) com NF1.

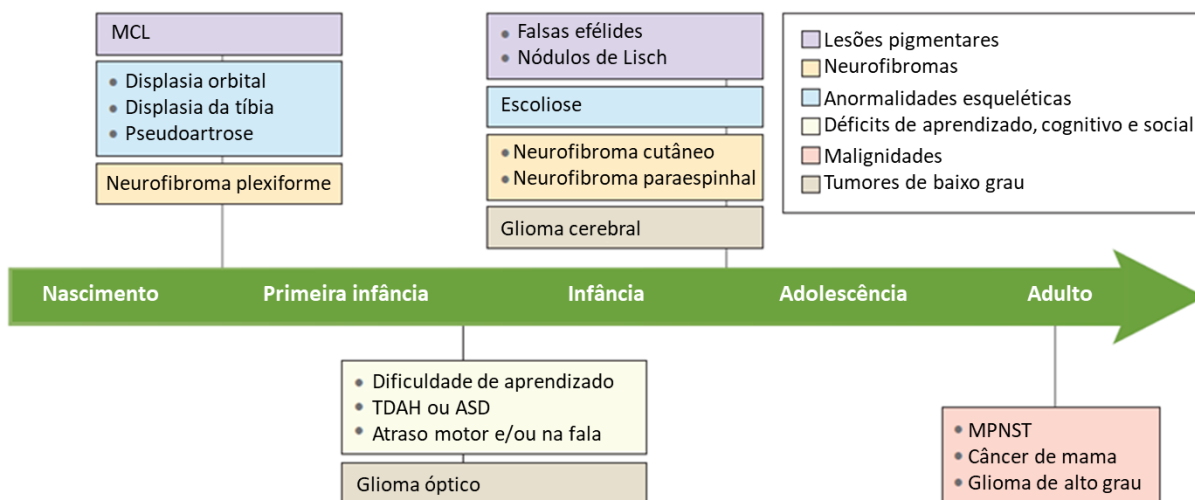
Dentre as manifestações clínicas, as mais comuns são as manchas café-com-leite, falsas efélides axilares e/ou inguinais e neurofibromas (Figura 3 e Figura 4, Tabela 1) (FRIEDMAN, 1999; PASMANT et al., 2012). Outros aspectos frequentemente observados são transtornos cognitivos, alterações esqueléticas, baixa estatura, macrocefalia, complicações cardiovasculares e deficiências neuropsicológicas (COSTA et al., 2014; JETT; FRIEDMAN, 2010; PASMANT et al., 2012). Além destas, o grupo de pesquisa do Centro de Referência em Neurofibromatoses (CRNF) de Minas Gerais identificou nos pacientes com NF1 características como transtorno do processamento auditivo, redução da força muscular, dificuldade na motricidade orofacial e o sinal do segundo dedo do pé (Figura 5) (BATISTA et al., 2010, 2014; FARIA et al., 2012; SOUZA et al., 2009b).

Figura 3: Manifestações clínicas mais comuns na NF1.



Fonte: Figura adaptada de Rodrigues et al. 2014; e Cartilha sobre Neurofibromatose do CRNF 2008.
 Legenda: (A) Manchas café-com-leite, (B) efélides axilares, (C) neurofibromas cutâneos e (D) neurofibroma plexiforme (interno).

Figura 4: Idade do aparecimento dos principais sinais e sintomas da NF1.

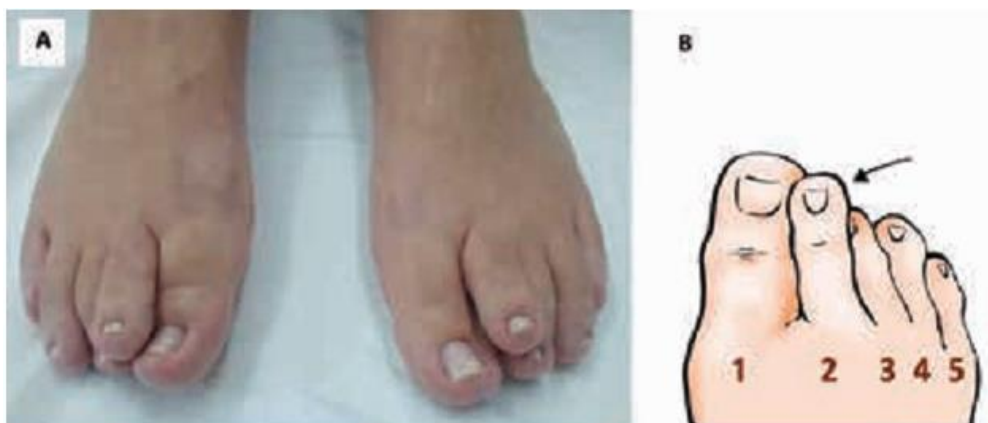


Fonte: Figura adaptada de GUTMANN et al., 2017.

Tabela 1: Idade do aparecimento e frequência dos principais sinais e sintomas da NF1

Sinal/Sintoma	Idade do aparecimento	Frequência (%)
MCL	Nascimento – 12 meses	> 95%
Falsas efélides	3 anos até a adolescência	> 85%
Nódulos de Lisch	> 3 anos	> 78%
Neurofibromas cutâneos	> 10 anos	> 75%
Neurofibroma plexiforme	Nascimento até 18 anos	26-40%
TMBNP	5 a 75 anos	10-13%
Glioma óptico	Nascimento até 10 anos	15%
Displasia óssea	Congênita	5%
Déficit de aprendizagem	> 2 anos	50-70%
Déficit de atenção e hiperatividade	A partir do nascimento	38%

Fonte: FERNER et al., 2007; HIRBE; GUTMANN, 2014; HYMAN; SHORES; NORTH, 2005; RODRIGUES et al., 2014.

Figura 5: Sinal do Segundo Dedo dos Pés (SSDP).

Fonte: FARIA et al., 2012.

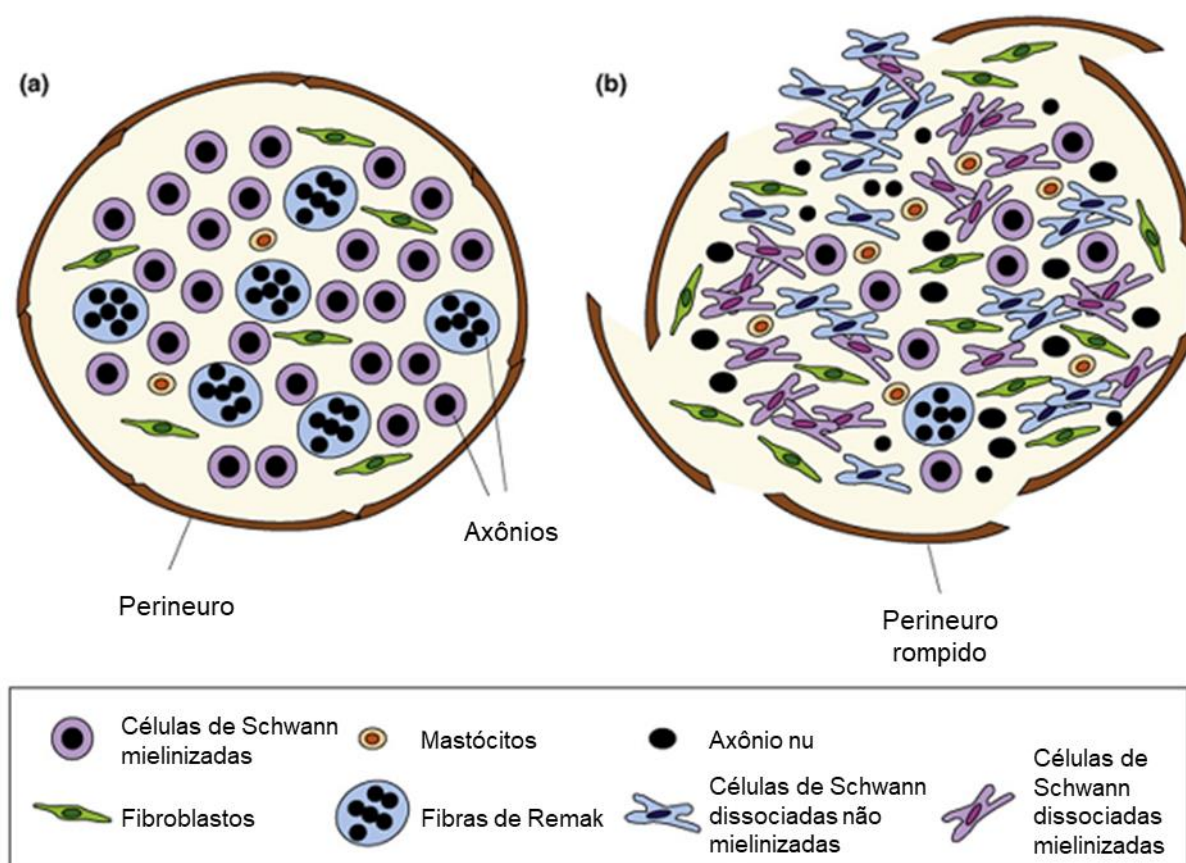
Legenda: Característica clínica descrita por Faria e colaboradores (2012), que auxilia no diagnóstico da NF1. (A) Foto dos pés da paciente MHRV, portadora de NF1, com o SSDP; (B) Desenho explicativo da elevação e acavalamento do segundo sobre e terceiro dedo.

Os neurofibromas são tumores primariamente benignos e podem ser cutâneos (endoneurais), subcutâneos (perineurais) ou plexiformes (epineurais ou perineurais) (RICCARDI, 2016). Existem ainda os neurofibromas denominados atípicos, os quais apresentam mudanças moleculares também encontradas em tumores malignos, sendo considerados, portanto, um tumor pré-maligno (GUTMANN et al., 2017; RICCARDI, 2016). Os

neurofibromas são compostos por uma variedade de tipos celulares, incluindo axônios, células de Schwann, fibroblastos, mastócitos, macrófagos, células perineurais e matriz extracelular (Figura 6) (JOUHILAHTI et al., 2011; PARRINELLO; LLOYD, 2009). Os neurofibromas cutâneos são geralmente assintomáticos, ocasionalmente provocam prurido e acometem cerca de 85% dos pacientes com NF1 aos 20 anos de idade. Não costumam se desenvolver antes da pré-adolescência, mas, quanto mais precocemente aparecem, maior a probabilidade de que sejam mais numerosos e mais disseminados na idade adulta (PARRINELLO; LLOYD, 2009; RATNER; MILLER, 2015).

Já os neurofibromas plexiformes (PNFs, do inglês *plexiform neurofibromas*) geralmente acompanham o trajeto de um nervo e apresentam-se como uma massa de tecido mole sob a pele. Os PNFs estão presentes em cerca de metade dos indivíduos com NF1, porém a maioria é interna, dificilmente detectados no exame clínico (BOYD; KORF; THEOS, 2009; JETT; FRIEDMAN, 2010). São congênitos e inicialmente benignos, embora exista uma chance ao longo da vida de 8 a 13% de malignização dos PNFs para os chamados tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (TMBNPs ou MPNSTs, do inglês *malignant peripheral nerve sheath tumour*) (EVANS et al., 2002). Alguns autores sugerem ainda que o risco do desenvolvimento do TMBNP pode ser ainda maior em pacientes com PNFs, chegando a até 50% (PARK et al., 2013; WARD; GUTMANN, 2005). Acredita-se que o gatilho para a malignização dos PNFs seja a perda de heterozigossidade (perda do alelo que não estava mutado) e/ ou o surgimento de novas mutações em genes modificadores, como *TP53*, *SUZ12*, *CDKN2A*, *TOP2A*, *SOX10*, *RRM2*, *CDH19* (revisado por MARTÍNEZ et al., 2017). Além disso, sugere-se que variações no tipo e grau das alterações moleculares podem ter relação direta com a gravidade do TMBNP (SPURLOCK et al., 2010).

Figura 6: Organização do nervo normal e do neurofibroma.



Fonte: Figura adaptada de PARRINELLO; LLOYD, 2009

Legenda: Diagrama demonstrando uma secção de (a) um nervo normal e (b) estrutura anormal nos neurofibromas. No nervo fasciculado normal (a), os axônios são envolvidos por células de Schwann, células da glia, com grandes axônios envoltos por células de Schwann e pequenos grupos de axônios menores envolvidos por células de Schwann não mielinizadas (fibras de Remak). Há ainda a presença de fibroblastos e alguns mastócitos na matriz extracelular. Já os neurofibromas (b), são estruturas complexas, desorganizadas, com um maior número de células de Schwann e fibroblastos, aumento da deposição de colágeno, infiltração de mastócitos e rompimento do perineuro. Além disso, a maioria das células de Schwann estão dissociadas dos axônios.

Os TMBNPs acontecem de forma esporádica também, mas são muito mais frequentes e agressivos em indivíduos com NF1, que possuem uma taxa de sobrevivência em 5 anos de 21 a 41% apenas (SPURLOCK et al., 2010). Esses tumores não respondem bem à quimio e radioterapia, sendo que a única possibilidade de bom prognóstico é reservada à situação de exérese cirúrgica com margem ampla diante de um diagnóstico precoce (STUCKY et al., 2012; TOVMASSIAN; ABDUL RAZAK; LONDON, 2016). Os TMBNPs são difíceis de detectar e devem ser suspeitados quando o paciente desenvolve dor intensa sem outra explicação plausível, aumento rápido no tamanho ou mudança na consistência de um PNF ou

aparecimento de déficit neurológico sem outra causa aparente (FERNER; GUTMANN, 2002; UPADHYAYA et al., 2008). Seu diagnóstico é dificultado ainda pela heterogeneidade de critérios morfológicos e carência de testes moleculares e imunohistoquímicos específicos. Histologicamente, observa-se alternância de áreas com elevada densidade celular com outras de baixa densidade celular e padrão em paliçada, células malignas em formato fusiforme (em 80% a 85% dos casos) ou arredondadas, núcleos hipercromáticos, com pleomorfismo, elevada atividade mitótica, invasão vascular e dos tecidos envoltentes e presença de áreas necróticas. Cerca de 50% a 90% dos casos são positivos para a proteína S-100, 50% para a proteína básica da mielina e 40% para leu-7 (ou CD 57) (CLARK et al., 2005; DIOGO et al., 2012; GHOSH; TALWAR; PRADHAN, 2010; RODRIGUEZ et al., 2012). Para confirmação diagnóstica, os pacientes têm indicação de fazer o exame de imagem PET-CT que apresenta sensibilidade de 89-100% e especificidade de 72-94% na identificação do TMBNP (TOVMASSIAN; ABDUL RAZAK; LONDON, 2016). Apesar de muito sensível o PET-CT ainda é pouco disponível e tem custo elevado, além de possuir potencial dano decorrente de irradiação em paciente com alto risco de malignização, sendo proibitivo seu uso repetido (FERNER et al., 2008).

Dessa forma ainda faltam marcadores moleculares específicos adequados que possam prever o processo de malignização do tumor plexiforme. Neste contexto, ressalta-se a necessidade de estudos que busquem identificar marcadores moleculares periféricos que possam contribuir para o reconhecimento da malignização do PNF.

1.2. Marcadores moleculares

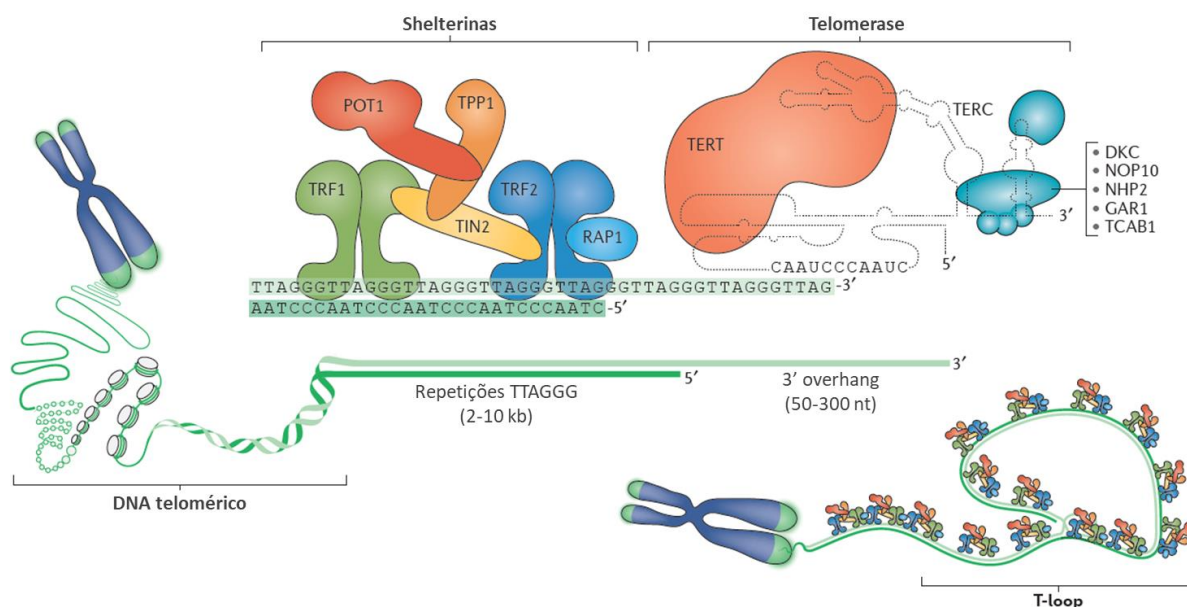
Marcadores moleculares são moléculas que podem ser mensuradas como indicadores de alguma condição biológica, especialmente na identificação de doenças e acompanhamento de intervenções terapêuticas (STRIMBU; TAVEL, 2010). Estas moléculas devem ser representativas da condição a ser avaliada e obtidas, preferencialmente, de forma não invasiva (ETHERIDGE et al., 2011). Dentre os biomarcadores disponíveis, destacam-se o comprimento relativo dos telômeros, a genotipagem de polimorfismos de base única (SNPs) e o perfil de microRNAs (miRNAs).

1.2.1. Telômeros

Telômeros são pequenas repetições em tandem (em humanos, TTAGGG) localizadas nas extremidades cromossômicas a fim de garantir a manutenção da integridade das mesmas (BLACKBURN, 2005). Proteínas, denominadas shelterinas, envolvem os telômeros e auxiliam

na formação da estrutura em loop, impedindo que a maquinaria de resposta ao dano ao DNA reconheça essas extremidades como dano (Figura 7) (MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017).

Figura 7: Telômero e telomerase.

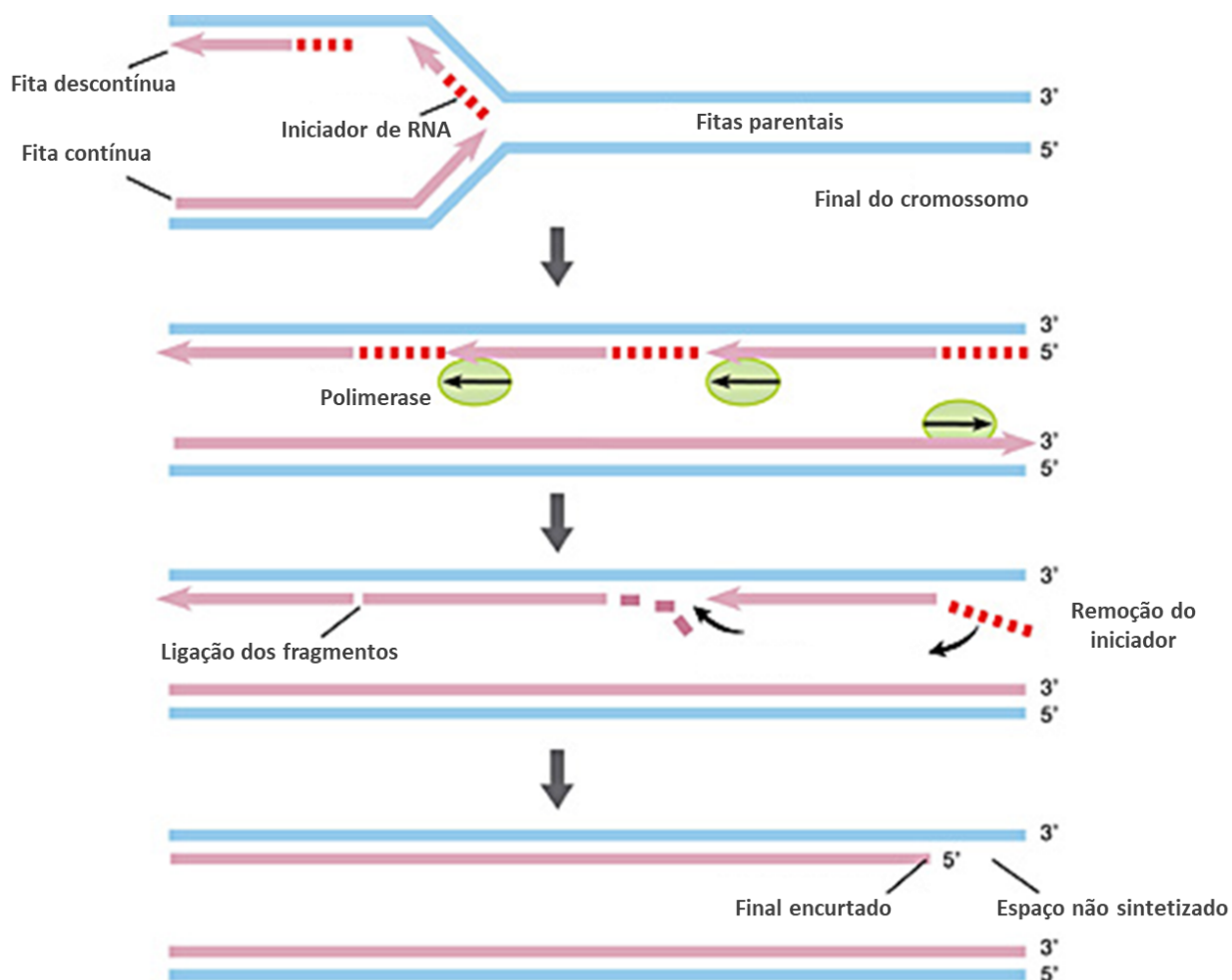


Fonte: Figura adaptada de MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017.

Legenda: Sequência telomérica em humanos (TTAGGG), complexo de shelterinas, telomerase (TERT e TERC) e algumas proteínas acessórias (DKC, NOP10, NHP2, GAR1 e TCAB1). DKC, disquerina; NHP2, *non-histone protein 2*; NOP10, proteína nucleolar 10; POT1, proteção dos telômeros 1; RAP1, proteína repressora/ ativadora 1; TCAB1, proteína telomerase dos corpos de Cajal 1; TIN2, fator de interação nuclear com TRF1 2; TRF, fator de ligação à repetição telomérica.

Ao longo das divisões celulares, os telômeros são ligeiramente encurtados (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990) devido ao problema de replicação final, que consiste na incapacidade da DNA polimerase em replicar o segmento final de DNA da fita descontínua após a remoção do último iniciador de RNA (Figura 8). Isto ocorre porque a DNA polimerase requer uma extremidade 3'OH livre para a adição de novos nucleotídeos na fita que está sendo sintetizada. Esta região final não terá como ser replicada a menos que uma enzima denominada telomerase esteja presente (Figura 7) (CALADO; YOUNG, 2009).

Figura 8: Problema de replicação final.



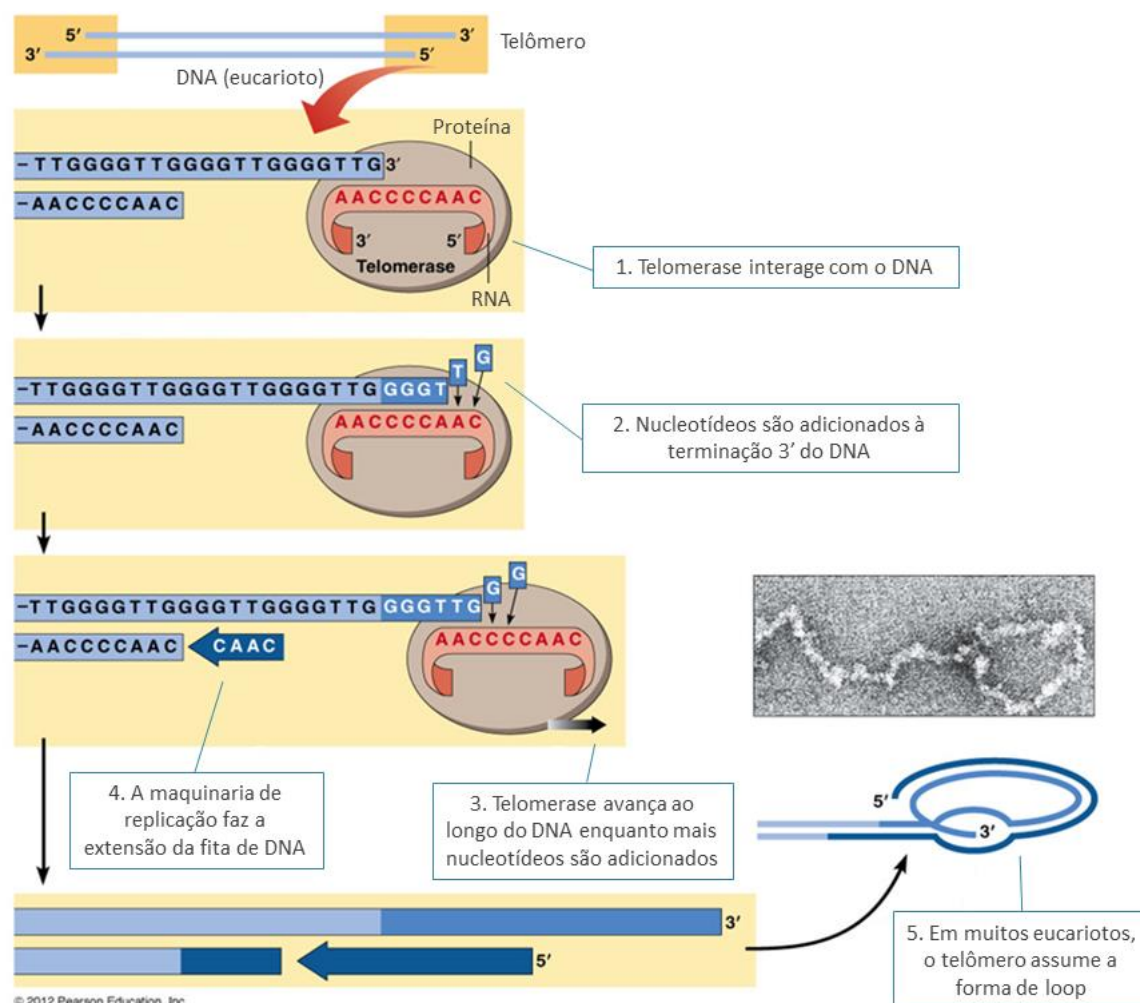
Fonte: Figura adaptada de BLACKBURN; SZOSTAK; GREIDER, 2009.

A telomerase apresenta uma subunidade catalítica com atividade transcriptase reversa (transcriptase reversa da telomerase, TERT) e um molde de RNA em sua estrutura (componente molde de RNA da telomerase, TERC, também chamado de RNA da telomerase, TR), que permite a replicação dos telômeros (Figura 7 e Figura 9) (BLACKBURN, 2005). Brevemente, este processo acontece da seguinte maneira: nas extremidades dos cromossomos, a fita descontínua fica um pouco menor que a fita molde após a retirada do último iniciador de RNA; a telomerase interage com a extremidade 3' (Figura 9, passo 1) e adiciona nucleotídeos à fita de DNA a partir do seu próprio molde de RNA (Figura 9, passos 2 e 3). A telomerase então é removida e um iniciador de RNA pareia-se à fita molde de DNA para continuar a síntese da fita descontínua através da DNA polimerase (Figura 9, passo 4). Por fim, o molde de RNA é removido e o telômero assume a estrutura em *loop* para proteção das extremidades cromossômicas (Figura 9, passo 5).

Na maioria dos tecidos somáticos, a telomerase encontra-se inativa (KIM et al., 1994; MIRACCO et al., 2014), o que contribui para o encurtamento telomérico a cada divisão celular. Assim, quando os telômeros atingem um tamanho crítico, as células entram em senescência e a maioria delas sofre apoptose. Disfunções nesta via podem provocar instabilidades genômicas (fusões cromossômicas e rearranjos) (PRATHER et al., 2015), contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças relacionadas ao envelhecimento (CALADO; YOUNG, 2009).

Diversos trabalhos apontam a importância do tamanho dos telômeros como biomarcadores em vários tipos de câncer (revisado por CALADO; YOUNG, 2009; HEAPHY; MEEKER, 2011; MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017). Estudos sugerem que cerca de 85-90% dos tumores possuem a telomerase ativa, o que propicia o alongamento dos telômeros (CHEN; CHEN, 2011; LIN et al., 2010; SHAY; BACCHETTI S., 1997). A combinação da reativação da telomerase e da disfunção telomérica gerando rearranjos genômicos nas células cancerígenas contribui para a formação de tumores mais agressivos (XU; LI; STOHR, 2012). Alguns autores sugerem um papel dual do comprimento telomérico e o desenvolvimento de cânceres. Enquanto que o encurtamento dos telômeros pode levar à instabilidade genômica, iniciando o processo da carcinogênese, o seu alongamento, por sua vez, parece contribuir para mais divisões celulares, aumentando as chances de anormalidades, o que favorece a carcinogênese (CESARE; REDDEL, 2010; MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017).

Figura 9: Replicação dos telômeros pela telomerase.



Fonte: Figura adaptada de <https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/19_16.jpg>, acessado em 10 de janeiro de 2018.

Até o momento, ainda são escassos os trabalhos avaliando o comprimento dos telômeros em pacientes com NF1. Recentemente, Jones e colaboradores demonstraram que indivíduos com TMBNP apresentaram telômeros menores quando comparados àqueles com neurofibromas cutâneos e plexiformes (JONES et al., 2017). Em contraste, alguns estudos encontraram um aumento na atividade da telomerase em amostras de tecido de TMBNPs, mas não em PNFs (MANTRIPRAGADA et al., 2008; VENTURINI et al., 2012), o que corrobora o fato de que a telomerase está ativa na maioria dos cânceres e que a NF1 é uma doença com grande predisposição ao surgimento de tumores. Neste contexto, surge a necessidade de elucidar a relação do comprimento telomérico e os diferentes perfis de tumores na NF1.

1.2.2. Genotipagem de SNPs

Com o advento do Projeto Genoma Humano, diversas variantes genéticas foram descritas na população, sendo os SNPs as mais frequentemente relatadas. Por definição, um polimorfismo é uma mutação encontrada em pelo menos 1% da população. Em geral, a média de SNPs no genoma humano é de 1:1000 pares de bases, ocorrendo principalmente em regiões não codificantes (KIM; MISRA, 2007; LI; SADLER, 1991) e, embora esses não alterem a proteína diretamente, eles podem afetar a taxa de transcrição quando presentes em sítios regulatórios do gene (promotores, acentuadores, inibidores, regiões não traduzidas – UTR's). Assim, os SNPs têm sido amplamente utilizados como biomarcadores em uma variedade de condições biológicas, desde a identificação de grupos de risco até a determinação do melhor tratamento através da farmacogenética, contribuindo para o que chamamos de medicina personalizada.

Como abordado anteriormente, diversas mutações no gene da neurofibromina já foram descritas, contudo, sem a presença de *hotspots*, o que dificulta a análise de SNPs neste gene. Entretanto, a literatura propõe que genes modificadores, tais como o *p53*, *STAT3*, *BRCA1*, *SUZ12*, *AKT1*, possam contribuir para a variabilidade fenotípica observada (JETT; FRIEDMAN, 2010; RATNER; MILLER, 2015; REINHOLZ et al., 2009; YAP et al., 2014). Portanto, torna-se interessante a investigação de SNPs em possíveis genes modificadores que possam auxiliar na identificação da população de maior risco para a malignização dos PNFs, a fim de permitir uma intervenção precoce.

1.2.3. MicroRNAs

Observados pela primeira vez em estudos com nematódeos (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), os miRNAs pertencem ao grupo de pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs), envolvidos na regulação da expressão e tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs) na célula. Estas moléculas são constituídas por uma dupla fita de RNA com cerca de 19-24 nucleotídeos e são reguladores essenciais na tradução por parearem a sequências complementares dos mRNAs alvo (LIN; GREGORY, 2015; RANA, 2007). De acordo com os bancos de dados, um miRNA pode regular e ser regulado por diversos genes, o que enfatiza ainda mais a sua importância biológica (HASHIMOTO; AKIYAMA; YUASA, 2013). Até o momento, mais de 4.000 miRNAs foram descritos em 23 espécies diferentes, regulando cerca de 23.000 genes e o número de interações miRNA-transcrito alvo já ultrapassa a marca de 420.000 interações (CHOU et al., 2018).

A biogênese dessas moléculas é semelhante à dos mRNAs, iniciando-se no núcleo (Figura 10) com a transcrição dos genes de miRNAs pela RNA polimerase II para formação dos miRNAs primários (pri-miRNAs), estruturas em forma de grampo com aproximadamente 60 a 100 nucleotídeos. Os pri-miRNAs são clivados pelo complexo Drosha-DGCR8 (região crítica do gene 8 na síndrome DiGeorge) para formarem os miRNAs precursores (pre-miRNAs), com cerca de 70 nucleotídeos, que são então exportados para o citoplasma com o auxílio da proteína exportina 5 e do seu cofator Ran-GTP. No citoplasma, os pre-miRNAs sofrem processamento pela Dicer, resultando em uma fita dupla de RNA (com 22 nucleotídeos em média), a qual irá unir-se a uma série de proteínas — entre elas Dicer, Argonauta (AGO1 e AGO2) e TRBP — formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Uma das fitas do miRNA maduro permanece ligada ao RISC, formando o miRISC, que irá interagir com os transcritos alvos e se ligar à extremidade 3'UTR dos mesmos, levando à degradação dos mRNAs (se houver uma combinação perfeita) ou inibição da tradução (combinação imperfeita) e consequente armazenamento dos transcritos nos corpos de processamento (*P-bodies*) (Figura 10). Os *P-bodies* não possuem maquinaria de tradução e, portanto, os transcritos armazenados em seu interior permanecem com a tradução reprimida (RANA, 2007; VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006). A combinação perfeita acontece mais frequentemente em plantas. Em animais, o pareamento da região core (sequência *seed*, que corresponde à posição 2 a 8 da extremidade 5') já é suficiente para o reconhecimento do transcrito alvo pelo complexo miRISC (BARTEL, 2009; CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016).

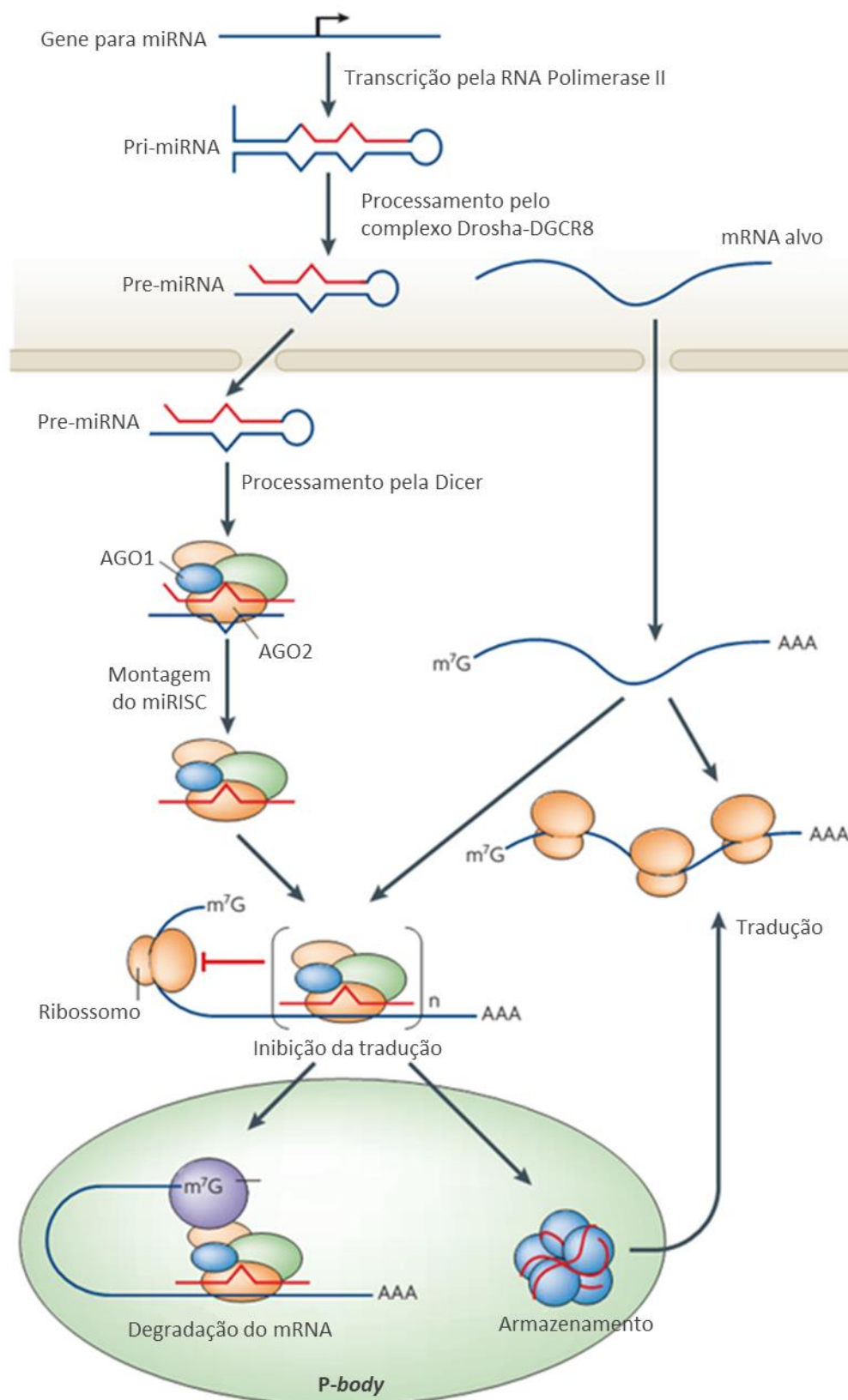
Devido a sua relevância funcional, os miRNAs são abundantemente expressos em todas as células humanas, regulando cerca de 60% de todos os genes codificadores de proteínas (FRIEDMAN et al., 2009; SAYED; ABDELLATIF, 2011). Eles são encontrados principalmente no interior da célula, embora estudos descrevam processos nos quais estas moléculas são transportadas para o espaço extracelular através de microvesículas, exossomos ou corpos apoptóticos (ETHERIDGE et al., 2011). Weber e colaboradores demonstraram a presença de miRNAs em diversos fluidos corporais, tais como plasma, urina, saliva, lágrimas, leite materno, lavado brônquico, colostro e fluidos peritoneal, seminal, amniótico e cérebro-espinhal (WEBER et al., 2010).

Os miRNAs circulantes (extracelulares) apresentam determinadas características que os tornam excelentes biomarcadores, tais como estabilidade nos fluidos celulares, correspondência à patogênese da doença, sequência conservada em diversas espécies e disponibilidade de métodos para sua detecção (reação da polimerase em cadeia quantitativa - qPCR, por exemplo) (ETHERIDGE et al., 2011). Assim, estudos envolvendo estas moléculas

são bastante promissores para as áreas de diagnóstico e terapêutica, principalmente no que se refere a neoplasias, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, infecções virais, diabetes (WAHID et al., 2010; WANG et al., 2015).

No câncer, a expressão de miRNA pode ser usada tanto para categorizar tipos diferentes de câncer quanto para identificar marcadores preditores de prognóstico. Atualmente existem diversos miRNA descritos localizados em genes associados a câncer ou a sítios frágeis, que regulam importantes funções na carcinogênese como proliferação e adesão celular, apoptose e angiogênese (CALIN et al., 2004; WANG et al., 2015). Nos tumores pouco diferenciados, os miRNAs podem ter papel ainda mais relevante no diagnóstico, aja vista que as classificações histopatológicas mostram-se, por vezes, insuficientes (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014; LU et al., 2005; ROSENFELD et al., 2008; SEDANI; COOPER; UPADHYAYA, 2012).

Figura 10: Biogênese e funcionamento dos miRNAs.



Fonte: Figura adaptada de RANA, 2007.

Legenda: Os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II em longos (60 – 100 nucleotídeos) miRNAs primários, sequências com estrutura em forma de loop. Os pri-miRNAs são clivados pelo complexo Drosha-DGCR8 (o chamado microprocessador) para formar pre-miRNAs com 70 nucleotídeos, em média. Os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma pela exportina 5 e seu cofator Ran-GTP, onde sofrem processamento pela Dicer, resultando em uma fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Os miRNAs maduros unem-se ao RISC para provocar o silenciamento gênico através da degradação dos transcritos alvo ou inibição da tradução. DGCR8: região crítica do gene 8 na síndrome DiGeorge; AGO: proteína Argonauta, RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA.

Alguns miRNA já foram associados ao processo de malignização do PNF para TMBNP, dentre eles: níveis aumentados de miR-214, miR-10 e miR-21, e redução nas taxas de miR-34a, miR-29c e miR-204 (revisado por Sedani et al. 2012; Masliah-Planchon et al. 2013). Estes miRNAs foram detectados em biópsias do tumor e, até onde se tenha conhecimento, apenas um estudo reportou o perfil de miRNAs provenientes de plasma de pacientes com NF1 (WENG et al., 2013).

Weng e colaboradores identificaram, através de sequenciamento de nova geração, dois miRNAs (miR-801 e miR-214) com expressão elevada em TMBNPs, independente se o paciente apresentava NF1 ou se era um caso esporádico do tumor. Além disso, dentre os pacientes com NF1, foi observado ainda que o miR-24 apresentou níveis aumentados em casos de TMBNP, o que qualifica este miRNA como um potencial biomarcador para identificar a malignização dos PNFs (WENG et al., 2013). Apesar destes relevantes achados, existe a necessidade da realização de novos estudos a fim de replicar tais dados, bem como identificar novos miRNAs associados ao processo de malignização.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Apesar de apresentar uma frequência de 1 a cada 3.000 nascidos vivos, a NF1 é considerada uma doença rara de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (doença rara é aquela que afeta até 65 pessoas em cada 100 mil indivíduos, isto é 1,3 indivíduo para cada duas mil pessoas). Sendo assim, ela ainda é pouco conhecida, mesmo por profissionais da área médica.

Como abordado anteriormente, uma das principais características desenvolvidas na NF1 são os neurofibromas, que podem ser classificados em neurofibromas cutâneos, subcutâneos e plexiformes (RICCARDI, 2016). E, embora sejam tumores inicialmente benignos, os PNFs apresentam chance de 8-13% de malignização durante a vida para os tumores malignos da bainha do nervo periférico (EVANS et al., 2002). Os TMBNPs são tumores difíceis de detectar e a única possibilidade de bom prognóstico é reservada à remoção cirúrgica com margem ampla diante de um diagnóstico precoce. Atualmente, para confirmação do diagnóstico, os pacientes têm indicação de fazer exame de imagem PET-CT que, além do custo elevado, expõe o paciente com alto risco de malignização à irradiação (FERNER et al., 2008). Dessa forma, ressalta-se a importância da existência de marcadores específicos para identificação precoce da malignização, a fim de permitir uma intervenção inicial.

Neste contexto, os marcadores moleculares surgem como alternativa pertinente para identificação de determinada condição biológica, especialmente nas áreas de prognóstico, diagnóstico e acompanhamento terapêutico. Cabe destacar que uma das vantagens dos biomarcadores é a obtenção dos mesmos de forma não invasiva, permitindo o fácil acesso e maior conforto ao paciente (ETHERIDGE et al., 2011; STRIMBU; TAVEL, 2010). Assim, o presente trabalho se propôs a caracterizar pacientes com NF1 quanto a seus marcadores moleculares periféricos que possam auxiliar tanto na identificação do grupo de risco para a malignização do PNF quanto na identificação precoce da mesma. Dentre os biomarcadores disponíveis, foram selecionados a genotipagem de polimorfismos, o comprimento relativo dos telômeros e o perfil de miRNAs (este último sob forma de revisão sistemática).

A caracterização dos marcadores moleculares nos pacientes com NF1 pode contribuir, futuramente, para que seja mais um critério de diagnóstico diferencial entre a NF1 e as outras RASopatias. Uma parcela dos pacientes diagnosticados com NF1, apresentam na realidade outra RASopatia, especialmente a Síndrome de Legius, uma doença com fenótipo menos grave (manchas café com leite, falsas efélides axilares e/ou inguinais, macrocrania e dificuldade de aprendizado) que a NF1 e que não exige um acompanhamento médico rígido

(BREMS et al., 2012). Entretanto, este campo está apenas no início e precisa ser mais explorado, o que justifica a relevância deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar marcadores moleculares em sangue periférico de pacientes com neurofibromatose tipo 1 para compreensão do processo de malignização dos PNFs para TMBNPs.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar microdeleções e alterações no número de cópias intragênicas do gene *NF1* nos pacientes com a doença;
- Caracterizar o tamanho relativo dos telômeros comparando indivíduos controle e pacientes com NF1 bem como pacientes com diferentes manifestações tumorais (PNF assintomático, PNF sintomático e TMBNP);
- Identificar o perfil genotípico para o gene da telomerase (*TERT*) nos indivíduos com NF1 quando comparados aos controles;
- Avaliar se há interação entre os polimorfismos de *TERT* e o comprimento relativo dos telômeros;
- Identificar se polimorfismos nos genes *TNF- α* e *AKT1* podem contribuir para o processo da malignização do tumor plexiforme;
- Realizar revisão sistemática para identificar os principais miRNAs e vias biológicas envolvidos na patogênese da NF1.

4. METODOLOGIA

O projeto proposto foi conduzido junto ao Centro de Referência em Neurofibromatose de Minas Gerais (CRNF) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e o Centro de Tecnologia em Medicina Molecular (CTMM), ambos localizados em Belo Horizonte, MG. Este projeto foi aprovado pelo Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (Plataforma Brasil) sob o registro do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 01344212.2.0000.5149 (Marcadores Moleculares em NF1). Além deste, já foram conduzidos outros projetos envolvendo os pacientes com NF1 no CRNF, abrangendo aspectos clínicos, exame por imagem (PET-CT), fonoaudiologia, nutrição, força muscular e neuropsicologia (BATISTA *et al.*, 2010, 2014; COSTA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2009, 2013; SOUZA *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2015).

4.1. Recrutamento e avaliação de pacientes

Os pacientes com NF1 foram avaliados e recrutados no CRNF (ver protocolo de atendimento em Anexo 1). Uma vez que os critérios diagnósticos estabelecidos pelo NIH (1988) datam de antes da descoberta da Síndrome de Legius (BREMS *et al.*, 2007), o CRNF adota não apenas dois, mas a presença de três dos critérios para confirmação do diagnóstico para NF1. Não houve restrição quanto a presença de comorbidades para o recrutamento dos pacientes, contudo, todos os dados clínicos foram minuciosamente avaliados. A caracterização clínica foi realizada por profissionais de saúde capacitados do CRNF, os quais coletaram informações demográficas e clínicas (anamnese e exame clínico completo). Os pacientes foram subdivididos nos grupos PNF assintomático, PNF sintomático e TBMNP, de acordo com a caracterização clínica e confirmação a partir do exame de imagem PET-CT (em geral, considerou-se TBMNP tumores com SUV > 3,5, mas cada caso foi analisado cuidadosamente por mais de um profissional capacitado). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

As características clínicas de 78 pacientes foram coletadas a partir de dados disponíveis nos prontuários. O dendograma de proximidade das manifestações clínicas foi construído no programa R (versão 3.4.3), utilizando o método de agrupamento hierárquico aglomerativo com o índice de dissimilaridade de Gower implementado no pacote *vegan* (versão 2.4-6).

4.2. Coleta e processamento da amostra biológica

Foram coletados 8 mL de sangue periférico através da flebotomia da veia antecubital, utilizando-se agulha de 20 gauge e dois tubos contendo o anticoagulante EDTA (4 mL de sangue por tubo), para posterior extração de DNA a partir dos leucócitos. O DNA foi extraído de acordo com adaptação do método salino previamente descrito por Lahiri e Schnabel (LAHIRI; SCHNABEL, 1993), como segue:

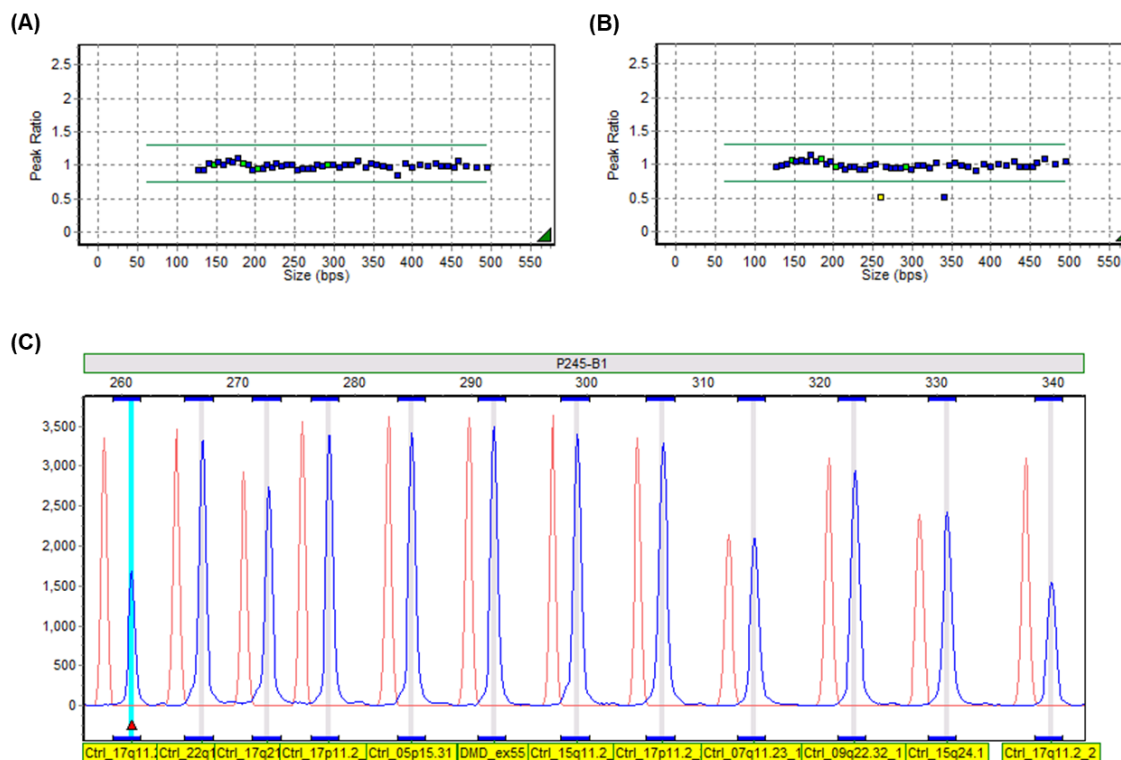
- A amostra coletada foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL juntamente com tampão TKM (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA) contendo 3% Triton X-100 (o volume de TKM adicionado é correspondente ao volume de sangue coletado).
- Agitou-se o tubo por inversão para promover a lise das hemácias e o mesmo foi centrifugado por 10 minutos a 1.200 g, 22°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 4 mL de TKM.
- O tubo foi agitado novamente por inversão, centrifugado por 10 minutos a 1.200 g, 22°C e o sobrenadante descartado. A lavagem com TKM foi repetida até que o *pellet* estivesse branco (apenas leucócitos, livre de hemácias).
- 850 µL de solução TKM contendo 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% foram adicionados aos tubos e estes homogeneizados para desfragmentação do *pellet*. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas novamente.
- Os tubos foram submetidos a centrifugação rápida (400 g por 1 minuto) para a transferência do sobrenadante para um tubo eppendorf de 1,5 mL.
- 300 µL de solução de NaCl 6 M foram adicionados e homogeneizados lentamente por inversão. Foi realizada centrifugação a 12.000 g por 5 min a 22°C e, em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo de 2 mL, com tampa de rosca, devidamente identificado.
- 450 µL de isopropanol foram adicionados ao sobrenadante e homogeneizado por inversão, lentamente, diversas vezes até o DNA a precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados a 16.000 g por 15 min a 22°C. O sobrenadante foi descartado vertendo-se o tubo.
- Para lavagem do *pellet*, adicionou-se 1 mL de etanol 70% e agitou-se rapidamente o tubo utilizando o vortex, com atenção para não desintegrar o *pellet*. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min a 22°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado vertendo-se o tubo. Foi realizada uma segunda lavagem com os mesmos parâmetros.

- Após o descarte do sobrenadante de etanol 70% da segunda lavagem, os tubos foram mantidos abertos por 15 min até a completa evaporação do álcool, atentando-se para não deixar o *pellet* ressecar.
- O *pellet* de DNA foi solubilizado em 400 µL de solução Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 a 8,0) e incubado em banho-maria a 56°C *overnight* (ou até a solubilização do *pellet*). Por fim, as amostras foram acondicionadas a 4°C.

4.3. Amplificação de sondas dependente de ligação (MLPA)

A MLPA foi realizada no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFMG, com colaboração da professora Dr^a Maria Raquel Santos Carvalho e, sua aluna, Gabriela Chadid Salazar. Esta técnica foi utilizada para identificar microdeleções e alterações no número de cópias intragênicas do *NF1*, de acordo com protocolo padronizado pelo fabricante do kit SALSA MLPA P245-B1 Microdeletion-1 Probemix (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda). O método consiste em quatro fases: (1) Desnaturação da fita de DNA e hibridização das sondas, (2) reação de ligação, (3) PCR e (4) Leitura em aparelho de eletroforese capilar. Assim, 50 ng/µL de DNA genômico foram hibridizados a uma mistura de sondas, com amplificação posterior dos produtos de ligação por PCR (35 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 1 min, e um ciclo de 72°C por 20 seg), utilizando um par de iniciadores universal (SALAZAR, 2013). Os fragmentos finais foram, então, separados e lidos em aparelho de eletroforese capilar (ABI 3137 DNA Analyzer, Applied Biosystems) na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Belo Horizonte - MG), sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas. Entre as vantagens do método estão o custo relativamente baixo, simplicidade, rapidez e sensibilidade (SCHOUTEN et al., 2002). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GeneMarker v.2.6.3 (**Figura 11**), com pontos de corte de 0.75 e 1.3 para deleções e duplicações, respectivamente.

Figura 11: Resultado ilustrativo da MLPA obtido através do software GeneMarker.



Legenda: Resultado ilustrativo da MLPA de um (A) indivíduo controle e (B) paciente com NF1, com deleção nas duas sondas de NF1. Em (C) está a representação do histograma das sondas para o indivíduo (B).

4.4. Determinação do comprimento relativo dos telômeros

Para a determinação do comprimento relativo telomérico foram selecionados 49 pacientes com NF1 (recrutamento previamente descrito), subdivididos nos grupos PNF assintomático ($n = 12$), PNF sintomático ($n = 21$) e TMBNP ($n = 13$). Dois pacientes não apresentaram PNFs e um deles obteve resultado inconclusivo no exame de PET-CT quanto à malignidade do PNF. O grupo controle consistiu de 49 voluntários saudáveis pareados em idade e sexo com os pacientes com NF1.

O tamanho relativo dos telômeros foi determinado através do método da reação da polimerase em cadeia em tempo real quantitativa (qPCR) descrita por Cawthon (CAWTHON, 2002). Brevemente, foram preparados dois mixes utilizando os pares de iniciadores para o telômero e para um gene constitutivo de cópia única (*S*, *single copy gene*), neste caso o *36B4*, que está localizado no cromossomo 12q24.23 e codifica para uma fosfoproteína ácida ribossomal PO (RPLPO) (BOULAY et al., 1999). As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no **Quadro 1**.

Quadro 1: Iniciadores utilizados para reação de qPCR**Telômero**

5' GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT 3'

5' TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA 3'

36B4

5' CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC 3'

5' CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA 3'

Fonte: CAWTHON, 2002.

Em uma placa de 96 poços, foram misturados 30 µL de mix e 20 µL contendo 75 ng de DNA. Para as reações com os iniciadores do telômero, o perfil de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 18 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 54°C por 2 minutos. Para o gene de cópia única, a reação foi submetida a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, e 58°C por 1 minuto. O kit PlatinumTaq (Invitrogen) foi utilizado para as reações de qPCR e o progresso da reação foi monitorado pela utilização do fluoróforo SYBR-Green (Invitrogen), intercalante com alta especificidade por DNA de fita dupla. Quando intercalado, o SYBR-Green emite fluorescência detectada pelo equipamento durante a progressão da qPCR, o que reflete a quantidade de DNA amplificado a cada ciclo, permitindo o acompanhamento da reação em tempo real.

As reações de qPCR foram feitas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Cada amostra teve a reação feita em triplicata e o resultado final foi dado a partir da média dos limiares dos ciclos (*cycle thresholds*, Ct) das mesmas. Triplicatas com o desvio padrão acima de 0,25 foram excluídas e a reação repetida.

Para a quantificação do comprimento relativo dos telômeros, os Cts das reações com os iniciadores do telômero e do gene constitutivo 36B4 foram calculados utilizando o algoritmo do software do equipamento ABI 7500 Real Time PCR System. A razão entre o Ct do telômero/Ct do 36B4 (razão T/S) reflete o tamanho relativo do telômero para cada amostra. Considerando-se a cinética exponencial da reação de qPCR, esta relação pode ser expressa pela seguinte equação: $[2^{Ct_{telômero}}/2^{Ct_{36B4}}]^{-1} = 2^{-\Delta Ct}$. Um número mínimo de 10% das amostras selecionadas aleatoriamente teve a reação de qPCR feita novamente como controle de qualidade para garantir a exclusão de possíveis erros laboratoriais.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.4.3), com o pacote nortest (versão 1.0-4). Uma vez que os dados não se mostraram normalmente

distribuídos de acordo com o teste Anderson-Darling, as análises posteriores foram feitas utilizando testes não paramétricos. O teste Mann-Whitney foi feito para comparação entre as médias dos telômeros nos grupos caso e controle e o teste Kruskal-Wallis foi realizado para comparação entre os subgrupos da NF1. O tamanho de efeito foi calculado a partir da razão entre o valor do escore Z sobre a raiz quadrada do tamanho amostral. Os gráficos foram gerados com o programa GraphPad Prism (versão 7.0).

4.5. Genotipagem por PCR em tempo real

A genotipagem foi realizada a partir de 50 ng de DNA através da PCR em tempo real, pelo método TaqMan® *Genotyping*. Esta técnica baseia-se na replicação do fragmento de DNA de interesse, a partir da utilização de sondas (probes) específicas (**Figura 12 e Tabela 2**), que consistem em oligonucleotídeos ligados a um fluoróforo. Desta forma, após a hibridização das sondas à fita de DNA complementar, ocorre a extensão do fragmento pela DNA polimerase que, ao clivar a probe, faz com que o fluoróforo seja liberado, permitindo a detecção da fluorescência pelo equipamento (**Figura 12**). Dado que cada sonda apresenta uma fluorescência alelo específica, o aparelho pode realizar a discriminação alélica a partir da fluorescência liberada durante a reação.

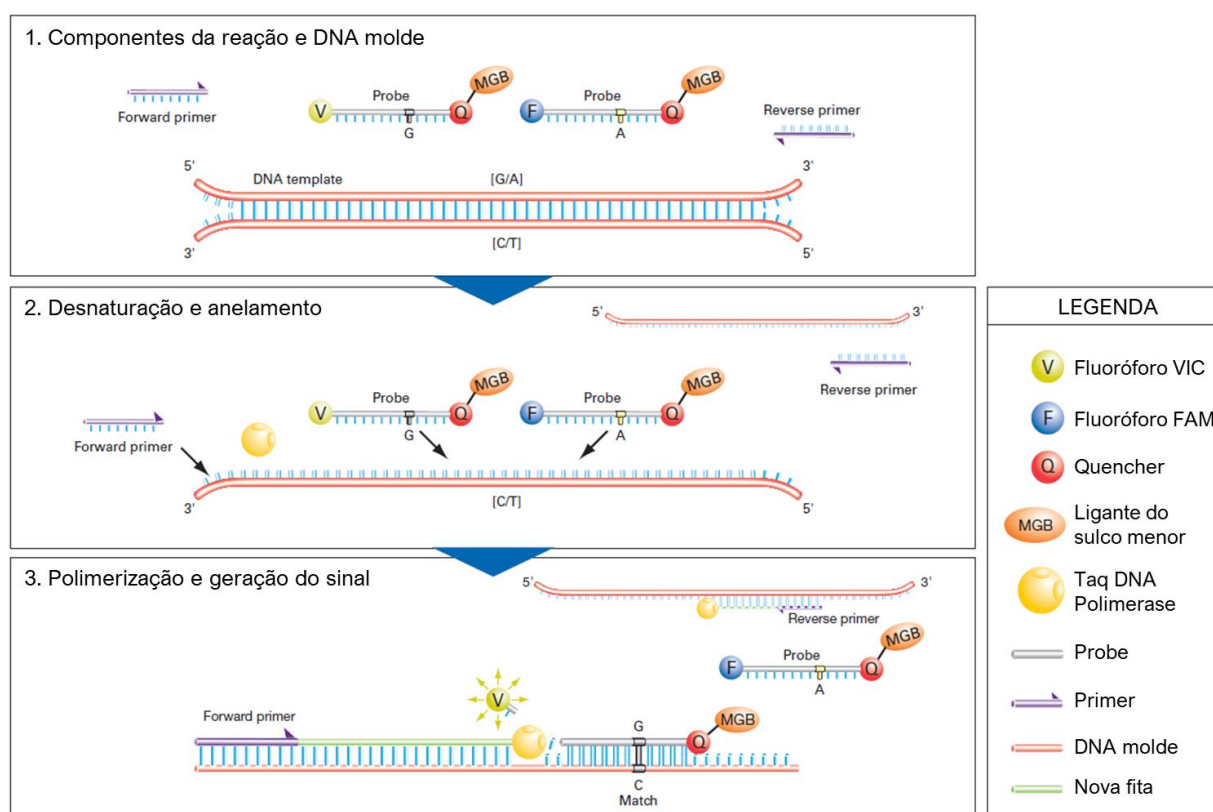
Foram selecionados SNPs previamente descritos na literatura relacionados a algum tipo de câncer e com frequência do alelo menos frequente (MAF) maior que 10%, o que configura um bom poder de detecção de genótipos de risco (ARDLIE; LUNETTA; SEIELSTAD, 2002; DE LA CRUZ; RASKA, 2014; TABANGIN; WOO; MARTIN, 2009). A PCR foi preparada em placas de 96 poços. Cada placa continha além das amostras a serem genotipadas, dois controles negativos, constituídos por todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA. Cada reação continha 3,5 µL do kit *TaqMan® Genotyping PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 3,4 µL de água deionizada, 0,1 µL da sonda (Thermo Fisher Scientific) e 1 µL de DNA (50 ng/µL), totalizando 8 µL.

A reação foi realizada no aparelho CFX Real-Time PCR Detection Systems (BioRad) com as seguintes temperaturas: 95°C por 10 minutos, acompanhado por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A leitura da fluorescência foi feita ao final de cada ciclo. Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado o modo de discriminação alélica do software que acompanha o aparelho. Ao menos 10% das amostras foram genotipadas novamente como controle de qualidade.

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi feita utilizando-se o programa Haploview (versão 4.2), e a análise de haplótipos foi feita no programa Haploview (versão 4.2)

(BARRETT et al., 2005) e Unphased (versão 3.1) (DUDBRIDGE, 2008). As demais análises foram realizadas no programa R (versão 3.4.3). O desequilíbrio de ligação (LD) foi representado pelo valor de D' . As diferenças nas frequências genótípicas entre indivíduos controles e pacientes com NF1 foram mensuradas a partir do teste de Qui-quadrado de Fisher. Os modelos genéticos de codominância, dominância, recessividade e log aditivo (quando o fenótipo se manifesta tendo como padrão o número de alelos de risco) foram avaliados através de modelos logísticos implementados no pacote SNPAssoc (versão 1.9-2) e o escore poligênico foi calculado através de modelo logístico com a função glm. A análise de correspondência foi realizada com o pacote ca (versão 0.70).

Figura 12: Esquema ilustrativo do mecanismo da genotipagem através do ensaio TaqMan® SNP Genotyping



Fonte: Figura adaptada do protocolo *TaqMan® SNP Genotyping Assays* fornecido pela Applied Biosystems (4332856 Rev. D).

Legenda: Inicialmente ocorre o pareamento da probe com a fita de DNA. Esta probe contém um ligante do sulco menor (MGB, do inglês minor groove binder) na sua extremidade 3', que confere um aumento da temperatura de Melting, permitindo a confecção de probes pequenas sem uma diferença muito grande na temperatura de anelamento. Além disso, as probes possuem um fluoróforo (V ou F) que tem sua fluorescência captada pelo quencher (Q) quando próximos. Após a hibridização, a Taq DNA

polimerase realiza a extensão do fragmento e, ao clivar a probe, faz com que o fluoróforo seja liberado, permitindo a detecção da fluorescência pelo equipamento.

Tabela 2: Localização cromossômica, gênica, polimorfismo e sequência das sondas utilizadas neste trabalho.

SNPs	Localização cromossômica ¹	Localização gênica	Polimorfismo ²	Sequência [VIC/FAM] ³
<i>TERT</i>				
rs10069690	Chr.5: 1279675	Intron	T>C (FWD)	TGTTGCACACGGGATCCTCATGCCA[C/T]ACCTCTGTCCACCTCACCCCACACT
rs2853669	Chr.5: 1295234	Intron	T>C (REV)	GTCCCCAGTCCCTCCGCCACGTGGG[A/G]AGCGCGGTCCCTGGGCGTCTGTGCC
rs2736100	Chr.5: 1286401	Intron	G>T (REV)	GAAAAGCAGGGCGGGGGCAAAGCTA[A/C]AGAAACACTCAACACGGAAAACAAT
<i>TNF-α</i>				
rs1800629	Chr.6: 31575254	Intron	A>G (FWD)	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC
<i>AKT1</i>				
rs3803304	Chr.14: 104772809	Intron	C>G (REV)	TGGGAGGTGCCAGGACCGCCTGGCG[C/G]AGGGGCAGGTGCAGCCTGGGGATG
rs1130214	Chr.14: 104793397	UTR 5'	G>T (REV)	GAGTCCAGAGCCCTCCAGCGCAAGC[A/C]CAAAAACCTCCTGGGAGAAACCCCA

Legenda: SNPs: polimorfismos de base única. Chr.: cromossomo. UTR: região não traduzida. FWD: SNPs reportados na orientação *forward* do genoma. REV: SNPs reportados na orientação *reverse* do genoma. VIC/FAM: fluoróforos.

¹Localização cromossômica de acordo com o GRCh38.

²Os polimorfismos foram consultados no banco de dados do NCBI.

³Informações fornecidas pela Thermo Fisher Scientific através da consulta no endereço eletrônico <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>>.

4.6. Revisão sistemática e análise *in silico* dos miRNAs na NF1

A estratégia de pesquisa utilizada para a revisão sistemática foi de acordo com o protocolo PRISMA (do inglês, *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-analysis*) (MOHER et al., 2009). Não foi registrado protocolo de revisão. Os estudos foram selecionados em quatro fases: identificação, *screening*, elegibilidade e inclusão. A identificação foi feita através de pesquisas em banco de dados (PubMed, Scopus e Web of Science) utilizando-se as palavras chaves (miRNA OU microRNA) E (Neurofibromatosis type 1 OU NF1). Os critérios de inclusão foram a avaliação de miRNAs em NF1 e estudos em humanos. Já os critérios de exclusão se definem a estudos com outras doenças que não a NF1, análises isoladas de schwannomas, artigos de revisão e capítulos de livros. Não houve restrições quanto à linguagem, data de publicação e periódico no qual o trabalho foi publicado. A lista de referências de outros artigos também foi utilizada para adicionar estudos. A fase de *screening* foi realizada através da leitura dos resumos dos artigos e, caso fosse selecionado, a leitura completa do trabalho. Todas as fases foram feitas por dois pesquisadores independentes e, se houvesse alguma discordância, um terceiro pesquisador faria a avaliação final.

Os miRNAs selecionados para este estudo foram submetidos a análises de bioinformática para identificar as redes de interação de vias biológicas envolvidas no processo da patogênese da NF1. Os dados de interação gene-miRNA foram obtidos do TargetScan (versão 7.0) (SHIN et al., 2010), dos quais somente as interações com dados experimentais foram utilizadas. Os genes alvo foram submetidos à análise de enriquecimento no Gene Ontology (GO) para investigar quais categorias estavam significativamente expressas no conjunto de genes. A rede construída com base nos dados de GO foi agrupada de acordo com o padrão de interação dos processos biológicos. O enriquecimento e o agrupamento foram feitos no programa Cytoscape (versão 3.2.1) (SHANNON et al., 2003) com os aplicativos Bingo (versão 3.0.3) (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005) e ClusterMaker2 (versão 0.9.5) (MORRIS et al., 2011), respectivamente. Os dados de GO não redundantes de alto nível foram selecionados usando o REVIGO (versão mar-2017) (SUPEK et al., 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra

Foram recrutados 79 controles (sexo feminino $n = 44$; idade $27,43 \pm 10,58$ anos) e 97 pacientes com NF1 (sexo feminino $n = 52$; idade $29,32 \pm 15,14$ anos), dos quais 78 tiveram seus dados clínicos coletados através da análise de prontuários disponíveis no CRNF. As frequências das principais características clínicas podem ser observadas na Tabela 3 abaixo. Cabe ressaltar que uma parcela dos prontuários não continha todas as informações requeridas na Tabela 3. Por este motivo, o cálculo da frequência relativa foi baseado apenas nos campos preenchidos, aqueles em branco foram desconsiderados.

Quando avaliada a relação de proximidade entre as características clínicas observadas na NF1, foi possível notar que MCL, falsas efélides, presença de neurofibromas e nódulos de Lisch mostraram-se mais coincidentes, seguidas de dificuldade de aprendizado, prurido e alterações na fala. Histórico familiar e displasia óssea também foram coincidentes, enquanto que a presença de outros tumores não apresentou relação próxima com as demais características (**Figura 13**). Isso indica que a presença do histórico familiar, por exemplo, coincide, mais frequentemente, com a presença de displasia óssea no mesmo paciente, o que é um dado ainda não abordado na literatura. Cabe a ressalva de que as escolioses idiopáticas também foram consideradas alterações ósseas e, portanto, este critério não se limita às alterações diagnósticas da NF1 (pseudoartrose de osso longo e displasia da asa do esfenoide).

Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes com NF1.

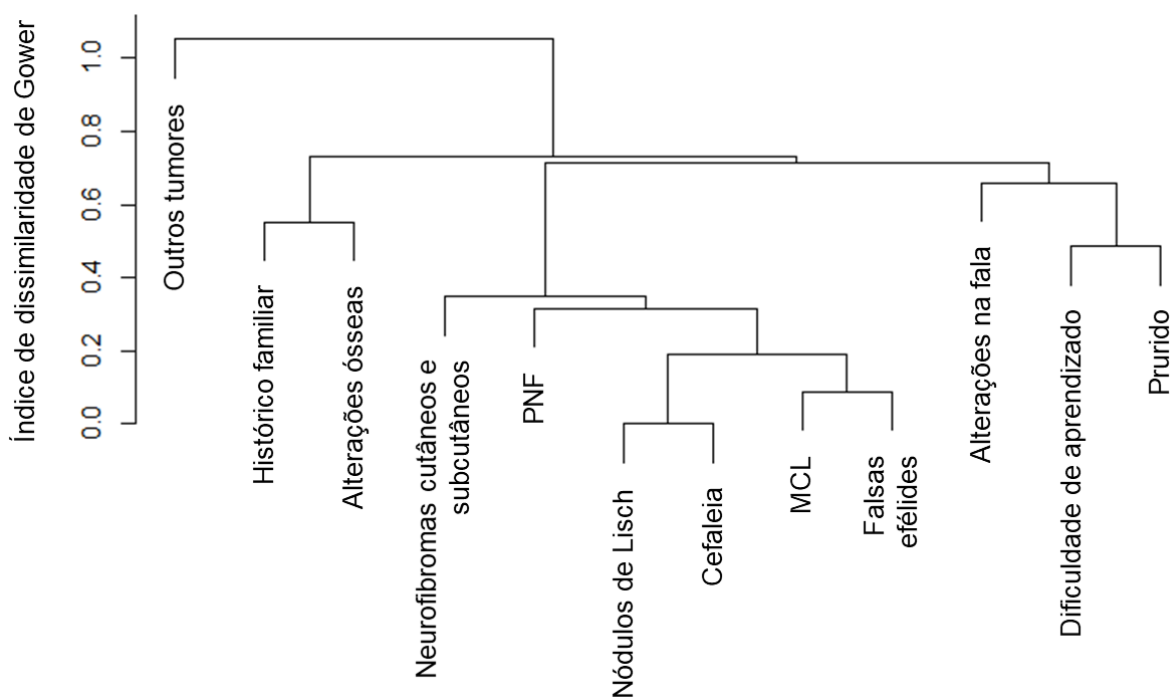
Características clínicas	n total (frequência %)	Frequência na literatura (%) ¹	PNF assintomático (%)	PNF sintomático (%)	TMBNP (%)
Sexo					
Masculino	42 (44,68)	50	8 (42,1)	10 (35,7)	10 (66,7)
Feminino	52 (55,32)	50	11 (57,9)	18 (64,3)	5 (33,3)
Manchas café com leite (≥ 6)	75 (98,68)	95	18 (100)	26 (100)	15 (100)
Efélides axilares e/ou inguinais	63 (92,65)	87	14 (87,5)	21 (95,4)	13 (92,8)
Neurofibromas cutâneos e subcutâneos	56 (77,03)	75	14 (82,3)	18 (75)	10 (71,4)
Neurofibromas plexiformes ²	63 (81,82)	35	19 (100)	28 (100)	15 (100)
PNFs assintomáticos	19 (26,03)	-	19 (100)	-	-
PNFs sintomáticos	28 (38,36)	-	-	28 (100)	-
TMBNP	15 (20,55)	10 - 13	-	-	15 (100)
Nódulos de Lisch ³	21 (84)	78	7 (100)	4 (80)	2 (100)
Displasia óssea	29 (54,72)	5	8 (66,7)	8 (44,4)	8 (72,7)
Histórico familiar	38 (52,05)	50	10 (62,5)	11 (45,8)	7 (46,7)
Dificuldade de aprendizado	38 (59,38)	50 - 70	10 (55,6)	14 (66,7)	7 (58,3)

¹Frequências baseadas em (FERNER et al., 2007; HIRBE; GUTMANN, 2014; HYMAN; SHORES; NORTH, 2005; RODRIGUES et al., 2014).

²Um dos pacientes com PNF mostrou resultado inconclusivo ao exame PET-CT, por isso, não foi possível classificá-lo como PNF sintomático ou TMBNP.

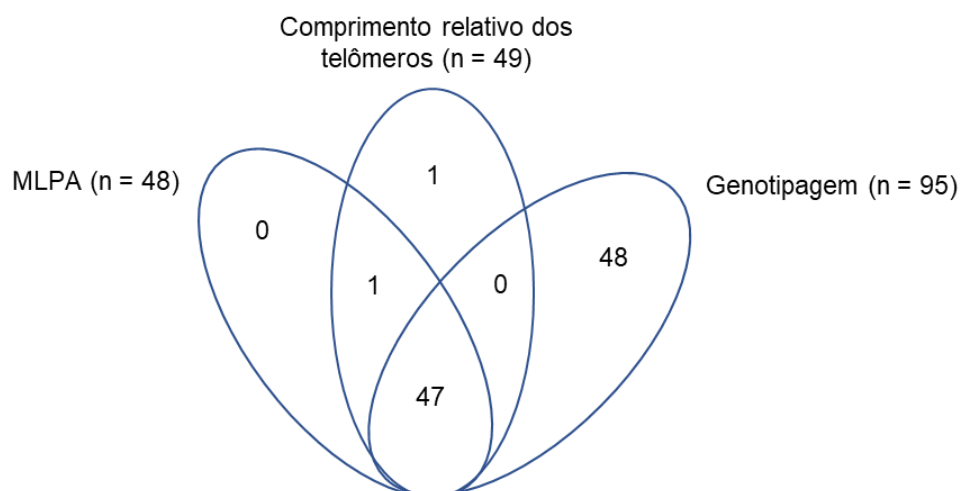
³Poucos pacientes possuíam exame oftalmológico confirmando a presença dos Nódulos de Lisch, a maioria não sabia informar, por isso as elevadas frequências nos subgrupos da NF1.

Figura 13: Dendograma de proximidade das características clínicas em NF1.



As análises laboratoriais descritas a seguir não contemplaram a amostra total de indivíduos. Assim, amostras de 47 pacientes com NF1 participaram de todos os processos laboratoriais avaliados, uma amostra foi submetida apenas a MLPA e ao comprimento relativo dos telômeros e uma amostra apenas ao comprimento relativo telomérico. Um total de 48 amostras tiveram apenas a genotipagem realizada (**Figura 14**). Esta discrepância se deve principalmente à disponibilidade de controles pareados por idade e sexo para a mensuração do comprimento relativo dos telômeros.

Figura 14: Diagrama ilustrativo correspondente ao número de indivíduos com NF1 em cada processo laboratorial.



5.2. Análise da MLPA

Para a MLPA, os 49 pacientes com NF1 que tiveram a mensuração do comprimento relativo dos telômeros foram selecionados. Um indivíduo apresentou resultados inconclusivos na MLPA e foi excluído da análise. Dos 48 pacientes, apenas 7 (14,58%) apresentaram deleções nas sondas do gene *NF1* (17q11.2), sendo três deles classificados como PNF assintomático e quatro como TMBNP (**Tabela 4**). Apesar da baixa amostragem, é interessante notar que nenhum dos 21 indivíduos com PNF sintomático apresentou deleção para *NF1*. Curiosamente, apesar do paciente E apresentar deleções também em outras sondas além das duas de *NF1* – deleção em uma sonda no gene *CREBBP* (16p13) e deleção em uma sonda no gene *TRPS1* (8q23) – não há evidências de alterações clínicas devido a essas deleções.

Tabela 4: Características clínicas dos indivíduos que apresentaram deleção na MLPA.

Paciente	A	B	C [†]	D	E	F [†]	G [†]
Grupo	PNF assint.	PNF assint.	TMBNP	TMBNP	PNF assint.	TMBNP	TMBNP
Sexo	F	F	M	M	M	M	M
MCL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Falsas efélides	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
cNF e scNF	Sim	Sim	-	Não	Sim	Sim	Sim
Regiões com PNF	Costas, mão	Costas	Face	Abdomen	Lábio	Abdomen	Pescoço, perna, braço, abdomen
Deformidades ósseas	Não	Escoliose	Não	Cifo escoliose	Assimetria facial e cranial	Não	Escoliose, macrocrania, assimetria de quadril
Histórico familiar	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Dificuldade de aprendizado	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Outros tumores	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Metástase pulmonar

Legenda: Todos os pacientes apresentaram deleção nas duas sondas para NF1 (17q11.2) e somente o paciente E apresentou deleções também em duas outras sondas: uma no gene *CREBBP* (16p13) e outra no gene *TRPS1* (8q23). PNF assint.: PNF assintomático; PNF sint.: PNF sintomático; cNF: neurofibroma cutâneo; scNF: neurofibroma subcutâneo. [†]Pacientes falecidos.

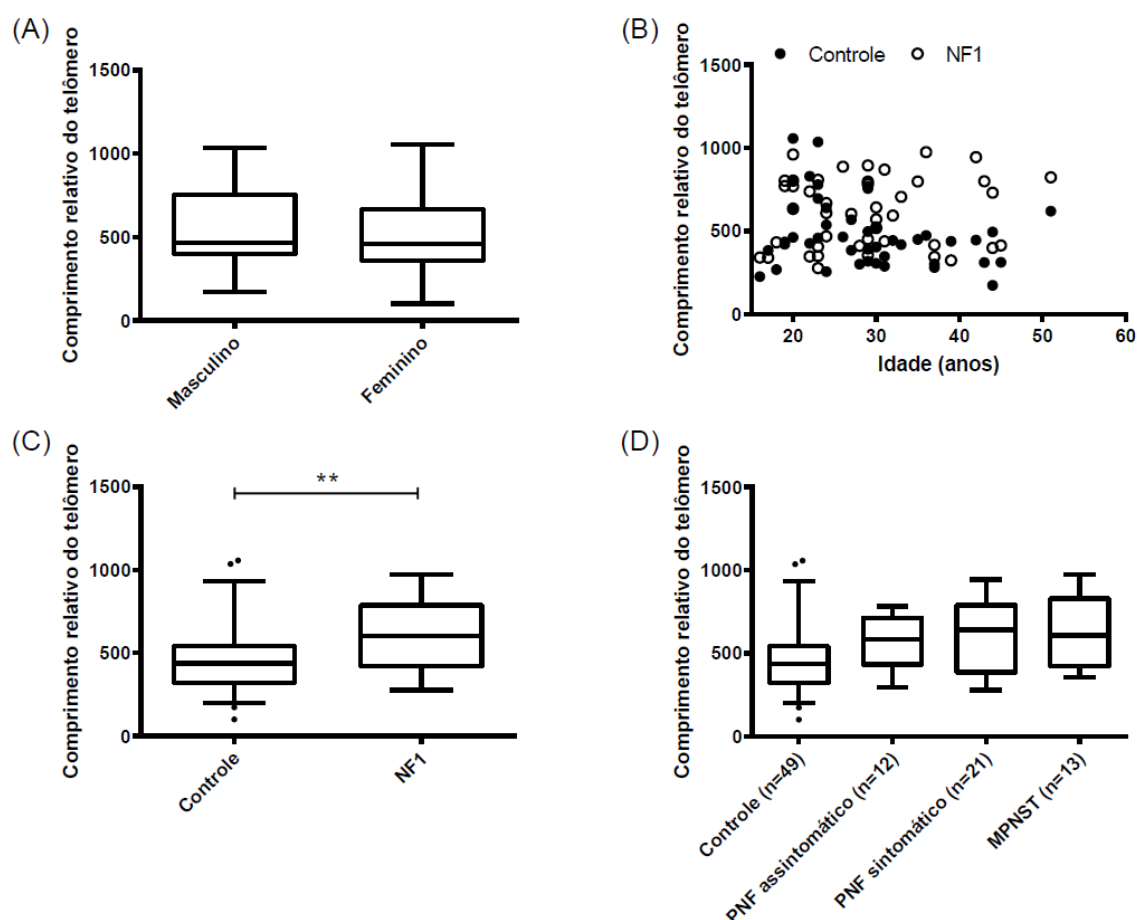
5.3. Indivíduos com NF1 apresentam maior comprimento relativo dos telômeros

Foram selecionados 88 indivíduos, divididos em 49 casos e 49 controles saudáveis pareados por idade (média de $27,2 \pm 9,80$ anos para NF1 e $26,8 \pm 10,22$ anos para controles, variando entre 5 a 52 anos) e sexo (27 mulheres e 22 homens em cada grupo). Os pacientes com NF1 foram classificados de acordo com os dados clínicos e o exame de PET-CT em PNF assintomático ($n = 12$), PNF sintomático ($n = 21$) e TMBNP ($n = 13$). Dos 49 pacientes recrutados, dois não apresentaram tumor plexiforme e um deles obteve resultado inconclusivo no exame PET-CT, não sendo possível, portanto, classificá-los nos subgrupos da NF1.

Não foram observadas correlações entre o comprimento relativo do telômero em relação ao sexo e idade (**Figura 15A** e **Figura 15B**). Quando comparados casos e controles, observou-se que os pacientes com NF1 apresentaram comprimento telomérico maior que os controles (NF1: $665,3 \pm 199,40$; Controles: $520,6 \pm 196,59$; $U = 457,0$; $Z = -3,03$; $p = 0,002$) (**Figura 15C**), com um moderado tamanho de efeito ($r = 0,34$).

No intuito de verificar se o comprimento relativo dos telômeros poderia ser um biomarcador para malignização dos PNFs para TMBNPs, foi realizada a comparação do tamanho telomérico entre os subgrupos de NF1. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,603$; PNF assintomático: $560,7 \pm 166,20$, PNF sintomático: $598,9 \pm 219,10$ e TMBNPs: $636,4 \pm 224,90$) (**Figura 15D**), apenas entre controles versus TMBNP ($p = 0,026$).

Figura 15: Análise do comprimento relativo dos telômeros.



Legenda: Análise do comprimento relativo dos telômeros de acordo com sexo (A), idade (B), entre grupo controle e NF1 (C) e entre os subgrupos da NF1 (D). ** $p < 0,01$.

5.4. Análise dos polimorfismos para *TERT*, *TNF- α* e *AKT1*

Cento e setenta e quatro indivíduos subdivididos em 79 controles saudáveis e 95 pacientes com NF1 foram genotipados para os SNPs de *TERT* (rs10069690, rs2853669, rs2736100). Não foi possível genotipar quatro indivíduos para o rs10069690, três para o rs2853669 e 15 para o rs2736100.

À exceção dos polimorfismos rs2853669 (*TERT*) e rs1800629 (*TNF- α*), os demais estavam de acordo com o EHW (Tabela 5). Na avaliação individual entre casos e controles, o rs2853669 mostrou-se fora do EHW apenas nos indivíduos com NF1. Cabe destacar que os dois SNPs que se mostraram fora do EHW (rs2853669 e rs1800629) juntamente com o rs3803304 apresentaram MAF discordante da MAF global (Tabela 5). O desequilíbrio de ligação calculado para os SNPs localizados no mesmo cromossomo (*TERT*, cromossomo

5p15.33 e *AKT*, cromossomo 14q32.33) não indicou presença de ligação entre eles, mesmo para os rs2853669–rs2736100, que demonstrou um fraco desequilíbrio de ligação ($D' = 0,5297$) (Tabela 6).

Tabela 5: EHW e MAF para os SNPs estudados.

SNP	EHW (p -valor)			MAF (%)	MAF Global* (%)
	Controles	NF1	Total		
<i>TERT</i>					
rs10069690	1,0	0,0161	0,0562	0,384	T=0.3476
rs2853669	0,4183	1×10^{-4}	5×10^{-4}	0,432	G=0.2979
rs2736100	1,0	0,3202	0,572	0,475	C=0.4846
<i>TNF-α</i>					
rs1800629	-	$1,87 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$	0,306	A=0.0903
<i>AKT1</i>					
rs3803304	-	0,94	0,94	0,395	G=0.2214
rs1130214	-	0,2124	0,2124	0,247	A=0.2402

*MAF Global de acordo com o 1000 Genomes. EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; MAF: frequência do alelo menos frequente.

Tabela 6: Desequilíbrio de ligação entre os SNPs avaliados neste trabalho.

Gene	SNPs	D'	p-valor
<i>TERT</i>	rs10069690 – rs2853669	0,2604	0,027
<i>TERT</i>	rs10069690 – rs2736100	0,2534	0,026
<i>TERT</i>	rs2853669 – rs2736100	0,5297	2×10^{-7}
<i>AKT1</i>	rs1130214 – rs3803304	0,2754	0,109

Quanto às frequências genotípicas, não houve diferenças quando comparados casos e controles para os SNPs de *TERT* (Tabela 7). Quando avaliada a formação de haplótipo, foi observado bloco haplotípico apenas em três situações para a combinação de todos os polimorfismos (rs10069690, rs2853669 e rs2736100, respectivamente), com um valor de p global de 0,0062. São eles: T-C-T e C-T-G, mais frequentes em NF1; e T-T-G, mais frequente nos controles (Tabela 8).

Tabela 7: Distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos de *TERT*.

SNP	NF1 (%)	Controle (%)	χ^2 (GL=2)	p-valor
rs10069690				
CC	42 (45,2)	28 (36,4)	3,266	0,195
CT	32 (34,4)	37 (48,1)		
TT	19 (20,4)	12 (15,6)		
	93 (100)	77 (100)		
rs2853669				
CC	29 (31,5)	14 (17,7)	5,109	0,077
CT	27 (29,3)	33 (41,8)		
TT	36 (39,1)	32 (40,5)		
	92 (100)	79 (100)		
rs2736100				
GG	22 (25,3)	16 (22,2)	0,945	0,623
GT	38 (43,7)	37 (51,4)		
TT	27 (31)	19 (26,4)		
	87 (100)	72 (100)		

χ^2 : qui-quadrado; GL: graus de liberdade.

Tabela 8: Haplótipos para os polimorfismos de *TERT* para casos e controles.

Haplótipo	NF1 (%)	Controle (%)	RC (IC 95%)	χ^2	p-valor
rs10069690 – rs2853669 (<i>TERT</i>) ($p = 0,0879$)					
T-C	33,62 (17,7)	14,6 (9,24)	1,00	3,315	0,068
T-T	37,91 (19,95)	48,39 (30,63)	0,34 (0,14 - 0,80)	3,746	0,053
C-C	54,13 (28,49)	46,4 (29,37)	0,51 (0,22 – 1,17)	0,083	0,774
C-T	64,33 (33,86)	48,61 (30,76)	0,57 (0,27 – 1,22)	0,03	0,862
rs2853669 – rs2736100 (<i>TERT</i>) ($p = 0,5338$)					
C-G	55,54 (29,54)	38,82 (24,57)	1,00	1,073	0,3
C-T	31,03 (16,5)	22,18 (14,04)	0,97 (0,44 – 2,19)	0,614	0,433
T-G	34,54 (18,37)	36,77 (23,28)	0,66 (0,33 – 1,31)	1,224	0,269
T-T	66,89 (35,58)	60,23 (38,12)	0,78 (0,45 – 1,35)	0,352	0,553
rs10069690 – rs2853669 – rs2736100 (<i>TERT</i>) ($p = 0,0062$)					
T-C-G	14,81 (7,79)	6,66 (4,21)	1,00	2,496	0,114
T-C-T	20,97 (11,04)	6,13 (3,88)	1,54 (0,17 – 13,95)	4,803	0,028
T-T-G	21,04 (11,08)	35,1 (22,21)	0,27 (0,06 – 1,17)	5,95	0,015
T-T-T	14,66 (7,72)	14,62 (9,25)	0,45 (0,09 – 2,17)	0,508	0,476
C-C-G	42,84 (22,55)	32,17 (20,36)	0,6 (0,14 – 2,63)	0,228	0,633
C-C-T	8,5 (4,47)	16,04 (10,15)	0,24 (0,05 – 1,18)	1,963	0,161
C-T-G	12,29 (6,47)	1,5 (0,95)	3,69 (0,33 – 41,16)	4,056	0,044
C-T-T	54,88 (28,89)	45,78 (28,97)	0,54 (0,14 – 2,12)	0,006	0,939

RC: razão de chances; IC: intervalo de confiança; χ^2 : qui-quadrado.

Com o intuito de observar qual estrutura genotípica melhor explicaria as diferenças entre os subgrupos PNF (assintomático e sintomático) e TMBNP, foram construídos modelos genéticos de codominância, dominância, recessividade e Log aditivo (**Tabela 9**). Apenas o rs10069690 de *TERT* apresentou diferença significativa em todos os modelos avaliados, sendo o melhor deles, o modelo de dominância (AIC = 57,6), com uma razão de chance de

10,33 (**Tabela 9**). Quando realizada a análise de correspondência, foi possível observar que, realmente, a homoziguidade para o alelo T possui forte relação com o perfil de TMBNP (**Figura 16**). Foi avaliada ainda a relação entre o comprimento relativo do telômero entre os subgrupos de NF1 (PNF e TMBNP) de acordo com o perfil genotípico para *TERT*. Todos os modelos foram avaliados (codominância, dominância, recessividade e Log aditivo), porém nenhum deles mostrou-se significativo (**Tabela 10**).

Com relação à análise haplotípica, quando se comparou a presença do tumor plexiforme e TMBNP nos pacientes com NF1, ao menos um haplótipo foi observado em cada combinação para *TERT* e o valor de p global foi menor que 0,05 para todas as situações (**Tabela 12 e Figura 17**). Para rs10069690 e rs2853669, o haplótipo T-T foi mais frequente nos indivíduos com PNF assintomático e sintomático e o haplótipo C-T nos TMBNP. Para rs2853669 e rs2736100, apenas um haplótipo foi formado (C-T) apenas no grupo PNF, não houve formação desse bloco haplotípico em TMBNP. Por fim, quando considerados os três SNPs, o haplótipo T-T-G foi mais frequente em PNF e o C-T-G em TMBNP (**Tabela 12 e Figura 17**).

Para avaliar a hipótese da possível presença de genes modificadores dentro do grupo NF1, foi realizada a genotipagem apenas dos indivíduos com a doença para os polimorfismos de *TNF- α* e *AKT1* (**Tabela 11**). Não foram observadas diferenças significativas para esses polimorfismos com relação ao perfil de malignização do tumor plexiforme e também não houve formação de bloco haplotípico para *AKT1* (**Tabela 12**).

Tabela 9: Modelos genéticos para o perfil de malignização em indivíduos com TMBNP e PNF (assintomático e sintomático) para os SNPs de *TERT*.

SNP	Modelo	TMBNP (%)	PNF (%)	RC (IC 95%)	p-valor	AIC
rs10069690	Modelo codominância					
	CC	12 (80)	12 (27,9)	1,00	0,0017	59,6
	CT	2 (13,3)	20 (46,5)	10,0 (1,90-52,55)		
	TT	1 (6,7)	11 (25,6)	11,0 (1,22-99,07)		
	Modelo dominância					
	CC	12 (80)	12 (27,9)	1,00	0,0003	57,6
	CT-TT	3 (20)	31 (72,1)	10,33 (2,47-43,18)		
	Modelo recessividade					
	CT-CC	14 (93,3)	32 (74,4)	1,00	0,0892	67,4
TT	1 (6,7)	11 (25,6)	4,81 (0,57-40,96)			
Log aditivo	15 (25,9)	43 (74,1)	5,23 (1,65-16,55)	0,0007	59,0	
rs2853669	Modelo codominância					
	TT	9 (60)	19 (44,2)	1,00	0,5718	71,2
	CT	4 (26,7)	16 (37,2)	1,89 (0,49-7,33)		
	CC	2 (13,3)	8 (18,6)	1,89 (0,33-10,80)		
	Modelo dominância					
	TT	9 (60)	19 (44,2)	1,00	0,2904	69,2
	CT-CC	6 (40)	24 (55,8)	1,89 (0,57-6,26)		
	Modelo recessividade					
	CT-TT	13 (86,7)	35 (81,4)	1,00	0,6342	70,1
CC	2 (13,3)	8 (18,6)	1,49 (0,28-7,93)			
Log aditivo	15 (25,9)	43 (74,1)	1,49 (0,64-3,45)	0,3386	69,4	
rs2736100	Modelo codominância					
	TT	4 (26,7)	13 (31,7)	1,00	0,8725	70,8
	GT	7 (46,7)	16 (39,0)	0,70 (0,17-2,94)		
	GG	4 (26,7)	12 (29,3)	0,92 (0,19-4,54)		
	Modelo dominância					
	TT	4 (26,7)	13 (31,7)	1,00	0,7141	69,0
	GT-GG	11 (73,3)	28 (68,3)	0,78 (0,21-2,93)		
	Modelo recessividade					
	GT-TT	11 (73,3)	29 (70,7)	1,00	0,8480	69,0
GG	4 (26,7)	12 (29,3)	1,14 (0,30-4,29)			
Log aditivo	15	41 (73,2)	0,96 (0,44-2,07)	0,9161	69,1	

RC: razão de chances; IC: intervalo de confiança; AIC: critério de informação de Akaike.

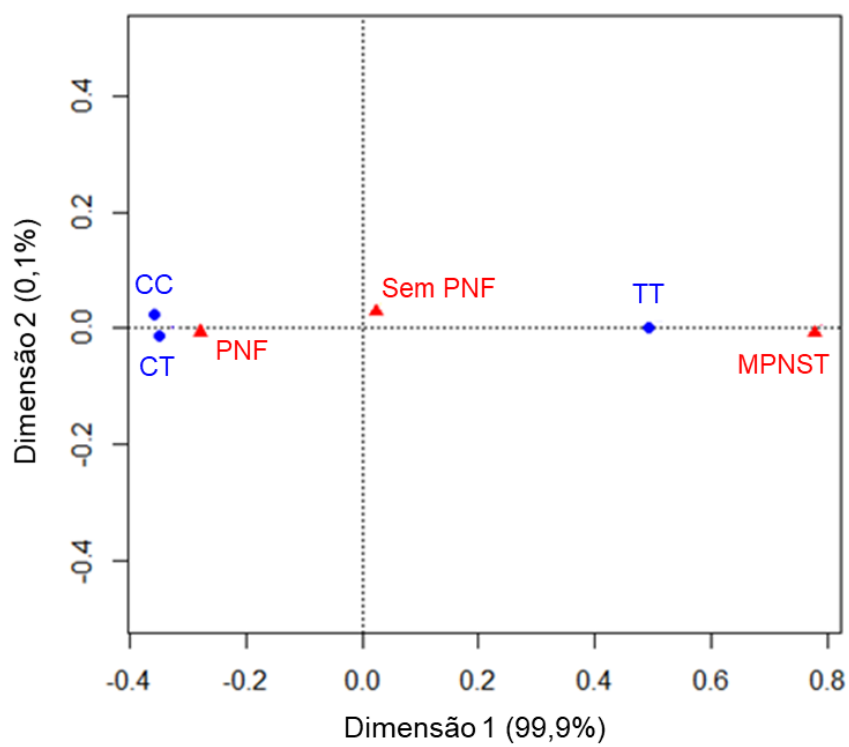
Figura 16: Análise de correspondência para o rs10069690 de *TERT*.

Tabela 10: Comprimento relativo dos telômeros de acordo com os genótipos para os polimorfismos no gene *TERT* em NF1.

SNP	Modelo	n	Média (SE)	Diferença (IC 95%)	p-valor	AIC
rs10069690	Modelo codominância					
	CC	18	617 (49,05)	0	0,7268	630
	CT	20	578,1 (48,9)	-50,91 (-188,08; 86,26)		
	TT	8	625 (81,73)	1,28 (-177,1; 179,67)		
	Modelo dominância					
	CC	18	617 (49,05)	0	0,5816	628,4
	CT-TT	28	591,5 (41,39)	-35,83 (-162,29; 90,64)		
	Modelo recessividade					
	CT-CC	38	596,6 (34,35)	0	0,7358	628,6
TT	8	625 (81,73)	28,1 (-134,1; 190,3)			
Log aditivo				-8,53 (-94,28; 77,22)	0,8464	628,6
rs2853669	Modelo codominância					
	TT	31	564,1 (36,54)	0	0,2739	641,2
	CT	14	674,6 (57,81)	110,52 (-22,49; 243,5)		
	CC	2	575,6 (228,12)	11,47 (-289,89; 312,8)		
	Modelo dominância					
	TT	31	564,1 (36,54)	0	0,1347	639,7
	CT-CC	16	662,2 (55,14)	98,14 (-28,15; 224,4)		
	Modelo recessividade					
	CT-TT	45	598,5 (31,53)	0	0,8832	642
CC	2	575,6 (228,12)	-22,91 (-326,85; 281)			
Log aditivo				65,65 (-40,87; 172,2)	0,2334	640,5
rs2736100	Modelo codominância					
	TT	14	539,4 (54,8)	0	0,337	628,4
	GT	19	650,8 (51,05)	111,41 (-35,14; 258)		
	GG	13	596,3 (56,61)	56,85 (-103,41; 217,1)		
	Modelo dominância					
	TT	14	539,4 (54,8)	0	0,1939	626,9
	GT-GG	32	628,7 (37,76)	89,25 (-43,34; 221,8)		
	Modelo recessividade					
	GT-TT	33	603,6 (38,16)	0	0,918	628,7
GG	13	596,3 (56,61)	-7,3 (-145,43; 130,8)			
Log aditivo				29,69 (-51,05; 110,4)	0,4749	628,2

SE: erro padrão; IC: intervalo de confiança; AIC: critério de informação de Akaike.

Tabela 11: Modelos genéticos para o perfil de malignização em indivíduos com TMBNP e PNF (assintomático e sintomático) para os SNPs de *TNF- α* e *AKT1*.

SNP	Modelo	TMBNP (%)	PNF (%)	RC (IC 95%)	p-valor	AIC
TNF- α _rs1800629	Modelo codominância					
	AA	6 (40)	23 (53,5)	1,00	0,5796	71,2
	AG	5 (33,3)	9 (20,9)	0,47 (0,11-1,93)		
	GG	4 (26,7)	11 (25,6)	0,72 (0,17-3,07)		
	Modelo dominância					
	AA	6 (40)	23 (53,5)	1,00	0,3671	69,5
	AG-GG	9 (60)	20 (46,5)	0,58 (0,18-1,91)		
	Modelo recessividade					
	AA-AG	11 (73,3)	32 (74,4)	1,00	0,9343	70,3
	GG	4 (26,7)	11 (25,6)	0,95 (0,25-3,59)		
Log aditivo	15 (25,9)	43 (74,1)	0,81 (0,41-1,63)	0,5635	70,0	
AKT1_rs1130214	Modelo codominância					
	GG	7 (46,7)	14 (31,1)	1,00	0,2503	70,7
	GT	5 (33,3)	26 (57,8)	2,60 (0,70-9,72)		
	TT	3 (20)	5 (11,1)	0,83 (0,15-4,54)		
	Modelo dominância					
	GG	7 (46,7)	14 (31,1)	1,00	0,28	70,3
	GT-TT	8 (53,3)	31 (68,9)	1,94 (0,59-6,40)		
	Modelo recessividade					
	GG-GT	12 (80)	40 (88,9)	1,00	0,3981	70,8
	TT	3 (20)	5 (11,1)	0,50 (0,10-2,40)		
Log aditivo	15 (25)	45 (75)	1,17 (0,48-2,85)	0,7343	71,4	
AKT1_rs3803304	Modelo codominância					
	GG	8 (53,3)	24 (53,3)	1,00	0,7307	72,9
	GC	6 (40)	20 (44,4)	1,11 (0,33-3,74)		
	CC	1 (6,7)	1 (2,2)	0,33 (0,02-5,97)		
	Modelo dominância					
	GG	8 (53,3)	24 (53,3)	1,00	1,00	71,5
	GC-CC	7 (46,7)	21 (46,7)	1,00 (0,31-3,23)		
	Modelo recessividade					
	GG-GC	14 (93,3)	44 (97,8)	1,00	0,4391	70,9
	CC	1 (6,7)	1 (2,2)	0,32 (0,02-5,43)		
Log aditivo	15 (25)	45 (75)	0,87 (0,31-2,43)	0,7918	71,4	

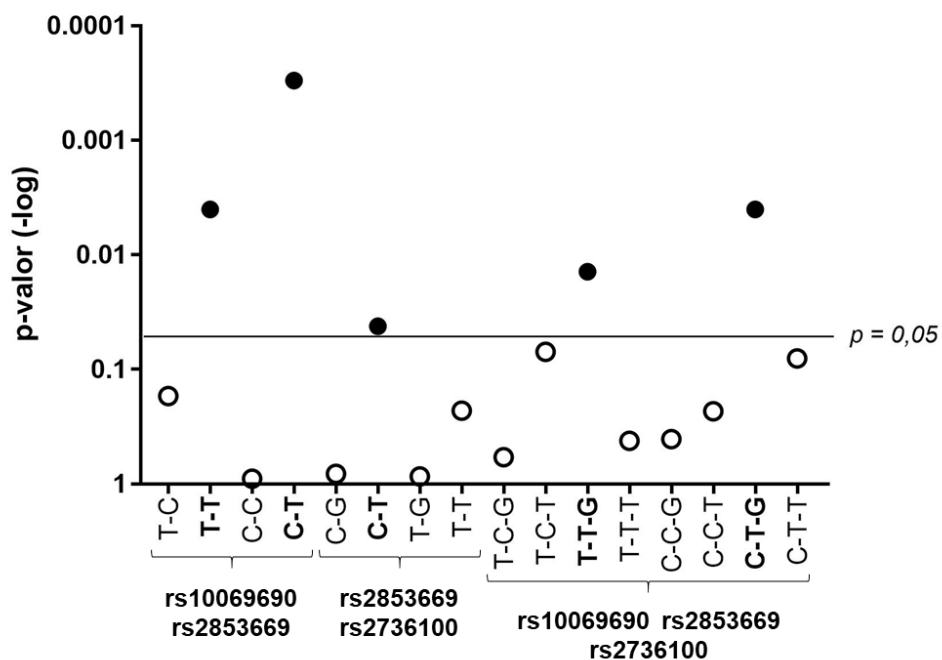
RC: razão de chances; IC: intervalo de confiança; AIC: critério de informação de Akaike.

Tabela 12: Haplótipos para os polimorfismos de *TERT* e *AKT1* de acordo com perfil do tumor plexiforme em pacientes com NF1.

Haplótipo	TMBNP (%)	PNF (%)	RC (IC 95%)	X ²	p-valor
rs10069690 – rs2853669 (<i>TERT</i>) (p = 0,001)					
T-C	2 (6,67)	13,51 (15,01)	1,00	1,874	0,171
T-T	2 (6,67)	30,1 (33,45)	0,45 (0,05 – 3,68)	8,074	0,004
C-C	6 (20)	20,1 (22,34)	2,02 (0,33 – 12,49)	0,016	0,899
C-T	20 (66,67)	26,29 (29,21)	5,14 (1,03 – 25,73)	12,8	0,0003
rs2853669 – rs2736100 (<i>TERT</i>) (p = 0,0477)					
C-G	8 (26,67)	17,85 (20,28)	1,00	0,054	0,815
C-T	0	14,82 (16,84)	0	4,117	0,042
T-G	7 (23,33)	25,34 (28,8)	0,62 (0,18 – 2,13)	0,032	0,859
T-T	15 (50)	30 (34,09)	1,12 (0,39 – 3,2)	1,444	0,229
rs10069690 – rs2853669 – rs2736100 (<i>TERT</i>) (p = 0,0014)					
T-C-G	2 (6,67)	8,56 (9,51)	1,00	0,303	0,582
T-C-T	0	7,88 (8,76)	0	3,288	0,07
T-T-G	1.58x10 ⁻⁷	20,71 (23,01)	3.51x10 ⁻⁸	6,02	0,014
T-T-T	2 (6,67)	6,73 (7,48)	1,27 (0,13 – 12,86)	0,65	0,42
C-C-G	6 (20)	11,72 (13,02)	2,19 (0,32 – 15,23)	0,691	0,406
C-C-T	0	4,88 (5,43)	0	1,426	0,232
C-T-G	7 (23,33)	3,74 (4,16)	8,01 (0,96 – 66,46)	8,458	0,004
C-T-T	13 (43,33)	25,77 (26,63)	2,16 (0,38 – 12,18)	3,056	0,08
rs1130214 – rs3803304 (<i>AKT1</i>) (p = 0,9584)					
G-C	3,49 (11,63)	10,27 (11,41)	1,00	0,022	0,883
G-G	15,51 (51,7)	43,73 (48,59)	1,04 (0,23 – 4,78)	0,574	0,811
T-C	4,51 (15,04)	11,73 (13,03)	1,13 (0,16 – 7,9)	0,039	0,843
T-G	6,49 (21,63)	24,27 (26,97)	0,79 (0,17 – 3,61)	0,283	0,595

RC: razão de chances; IC: intervalo de confiança; X²: qui-quadrado.

Figura 17: Distribuição dos valores de p para os haplótipos de *TERT* de acordo com o perfil tumoral em NF1.



Legenda: Em negrito os haplótipos com $p < 0,05$. Ver Tabela 12 para maiores informações.

Quando avaliado o modelo poligênico para os SNPs rs10069690 (*TERT*), rs1800629 (*TNF- α*) e rs1130214 (*AKT1*), não foi observada evidência suficiente para relacionar este modelo com o processo de malignização nos pacientes com NF1 (Tabela 13).

Tabela 13: Modelo poligênico.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Score Z	p-valor
Intercepto	0,2716	0,5555	0,489	0,625
Score	0,3357	0,2267	1,481	0,139

5.5. Revisão sistemática e análise *in silico* de miRNAs encontrados na NF1

A pesquisa nos bancos de dados forneceu um total de 35 estudos inéditos (**Figura 18**). Após cuidadosa análise, atentando-se para os critérios de inclusão e exclusão, 10 artigos completos foram incluídos na revisão sistemática (**Tabela 14 e Tabela 15**). Setenta e cinco miRNAs foram reportados, sendo 46 com níveis de expressão aumentados e 28 diminuídos. Oito miRNAs com expressão alterada foram encontrados em mais de um estudo (miR-210, miR-10b, miR-130b, miR-137, miR-214, miR-146a, miR-150, miR-195).

Uma vez que um miRNA pode regular e ser regulado por diversos genes (HASHIMOTO; AKIYAMA; YUASA, 2013), optou-se por identificar os processos biológicos envolvidos em vez de genes individuais. Portanto, 119 processos biológicos foram identificados regulados pelos miRNAs listados nas Tabela 14 e Tabela 15. Foram observados quatro grupos principais relacionados a sinalização e diferenciação celular, modificações pós-traducionais, regulação de processos metabólicos e regulação transcricional (**Figura 19 e Apêndice 9.2**). Os processos biológicos identificados incluem: sinalização célula-célula, diferenciação celular, transporte transmembrana, metabolismo lipídico, regulação da transcrição e pós-transcrição, modificação pós-traducional, modificação de histonas, ativação da via MAPK, apoptose e regulação da neurogênese, angiogênese e crescimento (**Figura 19**).

Figura 18: Representação da estratégia de pesquisa utilizada para a revisão sistemática.

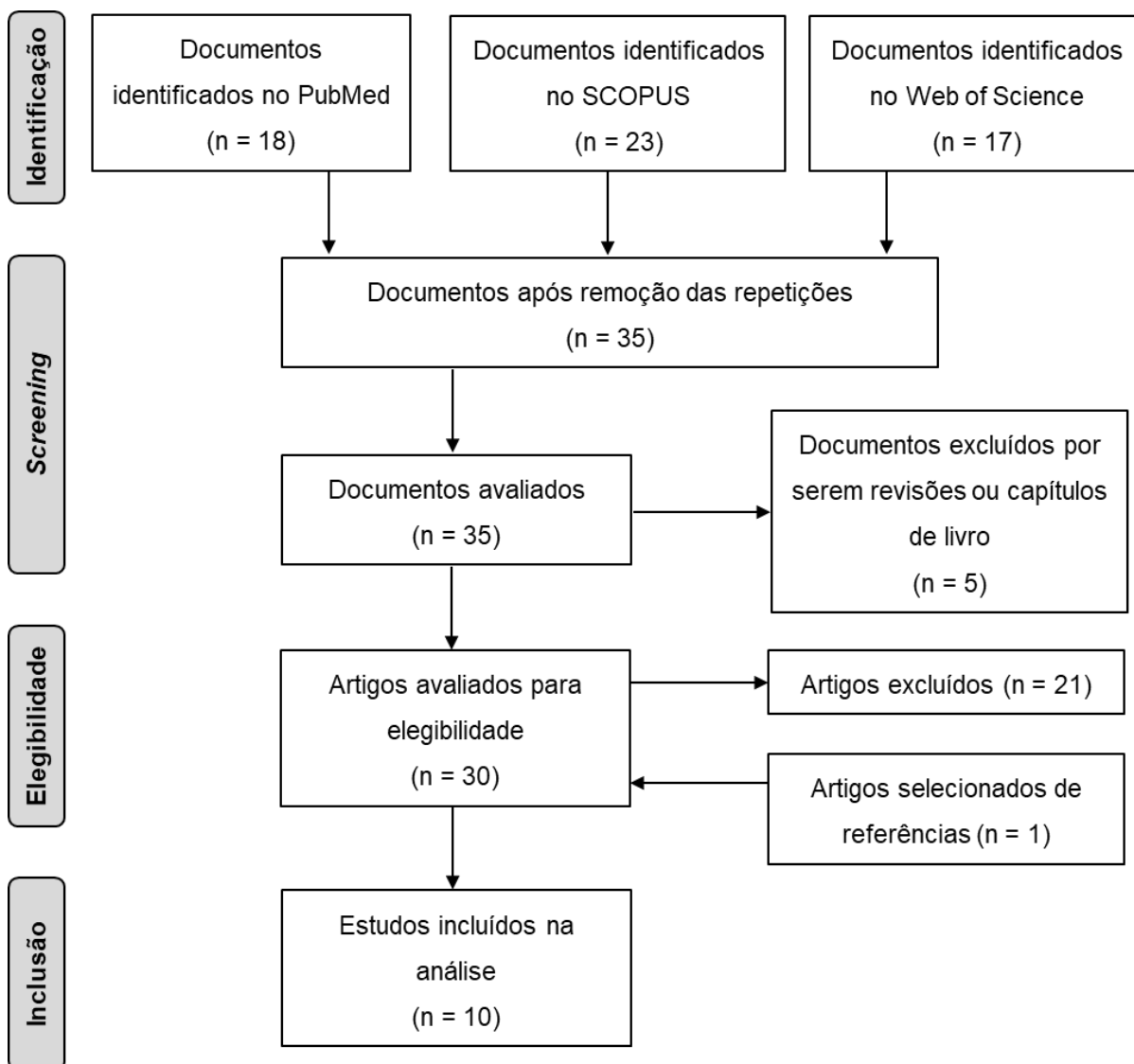


Tabela 14: Lista de miRNAs com níveis expressão diminuídos em TMBNPs.

Amostra biológica	Metodologia	Nº de miRNAs testados	miRNAs (n = 28)	Referência
Linhagem celular (ST8814 e T265p21)	RNeasy miRNA kit (Qiagen) ^a Microarray, qRT-PCR	1	miR-204	(GONG et al., 2012)
Amostras de tecido e linhagem celular para TMBNP	Trizol reagent (Invitrogen) ^a Microarray, qRT-PCR, Western Blotting	1	miR-30d	(ZHANG et al., 2014a)
Amostras de tecido de neurofibromas cutâneos, PNFs e TMBNPs	Acid-phenol guanidinium method ^a qRT-PCR	377	miR-139-5p, miR-150 , miR-338-3p, miR-195 , miR-146a , miR-95, let-7b, miR-186, miR-885-5p, miR-200c	(MASLIAH-PLANCHON et al., 2013)
Amostra de tecido de PNFs e TMBNPs e linhagem celular	miRNAeasy kit (Qiagen) ^a qRT-PCR	16	miR-30e*, miR-29c*, miR-29c, miR-340*, miR-30c, miR-139-5p, miR-195 , miR-151-5p, miR-342-5p, miR-146a , miR-150 , miR-223, let-7a, let-7g	(PRESNEAU et al., 2013)
Amostra de tecido de TMBNPs e linhagem celular	mirVana miRNA isolation kit (Ambion) ^a Microarray, qPCR	482	miR-34a, miR-517b, miR-29a, miR-30e-5p, miR-27a	(SUBRAMANIAN et al., 2010)

^aMétodo para extração de RNA total ou miRNA. qRT-PCR: RT-PCR quantitativa em tempo real. Em negrito os miRNAs encontrados em mais de um estudo.

Tabela 15: Lista de miRNAs com níveis expressão aumentados em TMBNPs.

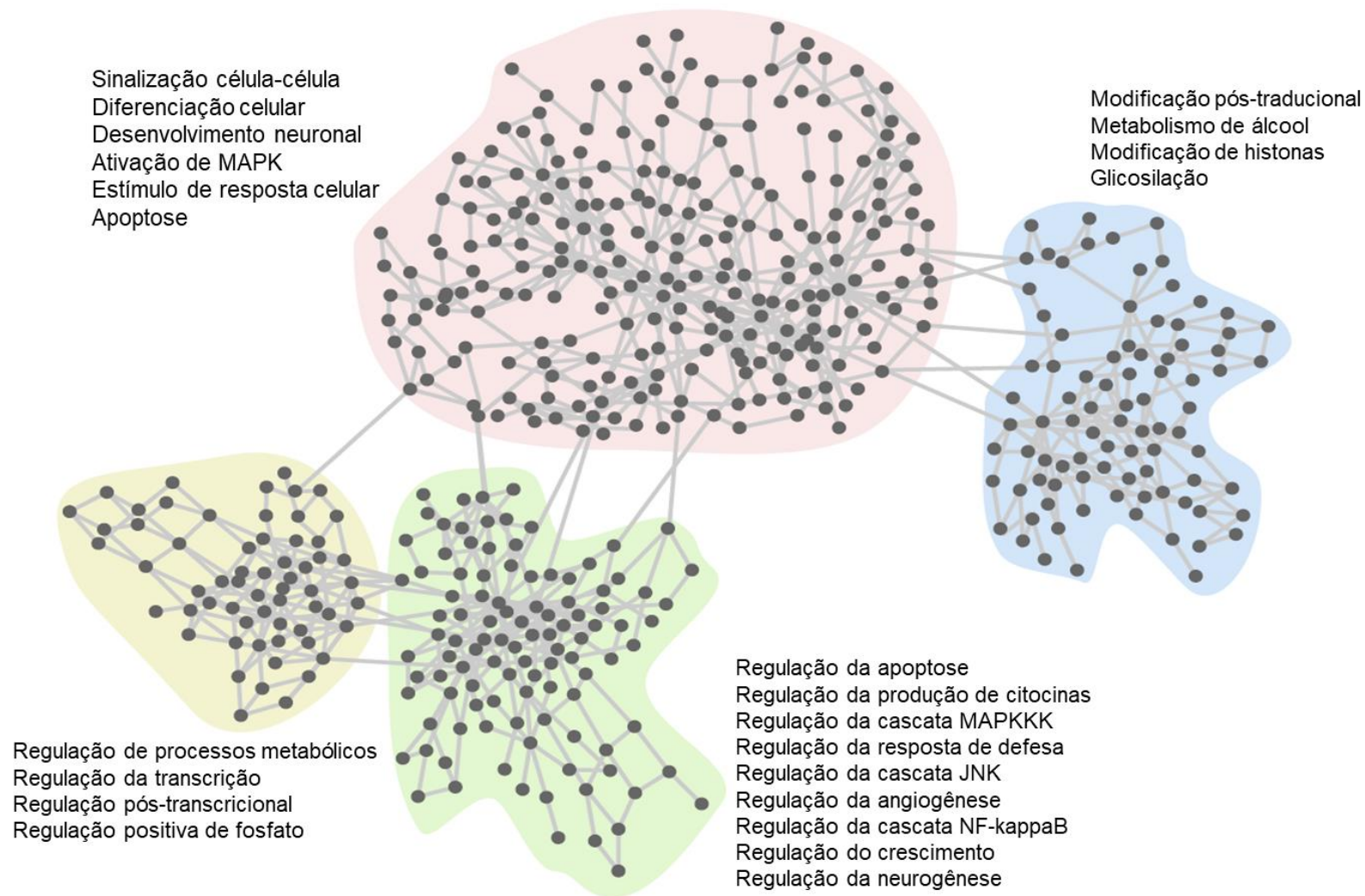
Amostra biológica	Metodologia	Nº de miRNAs testados	miRNAs (n = 46)	Referência
Linhagem celular (ST8814 e T265p21)	RNeasy miRNA kit (Qiagen) ^a Microarray, qRT-PCR	22	miR-10b , miR-155, miR-335, let-7a, let-7b	(CHAI et al., 2010)
Amostras de tecido de PNFs e TMBNPs	ISOGEN (Nippon Gene) ^a qRT-PCR	9	miR-21, miR-135b, miR-152, miR-130b , miR-92, miR-15b	(ITANI et al., 2012)
Amostras de tecido, linhagem celular (HEK 293) e cultura primária de células (neurônios, astrócitos e células de Schwann)	mirVana miRNA isolation kit (Ambion) ^a qRT-PCR, Western Blotting	3	miR-103, miR-137 , miR-128	(PASCHOU; DOXAKIS, 2012)
Sangue (soro)	mirVana PARIS miRNA Isolation Kit (Ambion) ^a qRT-PCR, Sequenciamento Solexa	107	miR-801, miR-214 , miR-24	(WENG et al., 2013)
Amostras de tecido de neurofibromas cutâneos, PNFs e TMBNPs	Acid-phenol guanidinium method ^a qRT-PCR	377	miR-135b, miR-449a, miR-210 , miR-301a, miR-9, miR-130b , miR-454, miR-19a, miR-106b, miR-135a, miR-137 , miR-31, miR-129-3p, miR-224, miR-10b , miR-148a, miR-18a, miR-452, miR-598, miR-196b, miR-145, miR-10a, miR-93, miR-20a, miR-19b, miR-484, miR-192	(MASLIAH-PLANCHON et al., 2013)

Continuação da Tabela 15

Amostra biológica	Metodologia	Nº de miRNAs testados	miRNAs (n = 46)	Referência
Amostra de tecido de PNFs e TMBNPs e linhagem celular	miRNAeasy kit (Qiagen) ^a qRT-PCR	16	miR-210 , miR-339-5p	(PRESNEAU et al., 2013)
Linhagem celular (ST88-14 e sNF96.2)	Trizol reagent (Invitrogen) ^a qRT-PCR	1	miR-210	(WANG et al., 2014)
Amostra de tecido de TMBNPs e linhagem celular	mirVana miRNA isolation kit (Ambion) ^a Microarray, qPCR	482	miR-214 , miR-377, miR-409-p, miR-487b, miR-99b	(SUBRAMANIAN et al., 2010)

^aMétodo para extração de RNA total ou miRNA. qRT-PCR: RT-PCR quantitativa em tempo real. Em negrito os miRNAs encontrados em mais de um estudo.

Figura 19: Rede de interações dos principais processos biológicos identificados.



6. DISCUSSÃO

Apesar de ter disso descrita há mais de 130 anos, a NF1 ainda permanece desconhecida para a maioria da população, incluindo profissionais da área da saúde. Acredita-se que, em parte, isso possa ser explicado pelo fato de esta ser considerada uma doença rara e sem representatividade social, uma vez que os indivíduos afetados são, muitas vezes, marginalizados da sociedade. Este trabalho foi proposto, portanto, no intuito de contribuir para a expansão do conhecimento acerca da NF1.

Como esperado, em nossa amostra, não houve diferença significativa no número de indivíduos com NF1 quanto ao sexo, aja vista que esta doença é de herança autossômica. Quanto às demais características clínicas obtidas durante a consulta médica, foi observada uma concordância com as frequências previamente descritas na literatura com exceção da presença de alterações ósseas, prurido e PNFs (ver **Tabela 3**). Neste último caso, cabe lembrar que um dos objetivos deste trabalho é identificar as diferenças nos perfis moleculares de pacientes com PNF e aqueles com TMBNP, por isso, a maioria dos indivíduos recrutados apresentavam ao menos suspeita clínica de PNF. Quanto às alterações ósseas e prurido, a discordância se deve ao fato de que poucos prontuários apresentavam esta informação preenchida, o que superestimou a frequência relativa dessas características.

A dificuldade de aprendizado, embora não seja considerada um dos critérios diagnósticos para NF1, esteve presente em quase 60% da amostra estudada ao exame clínico, corroborando dados da literatura que apontam para frequências em torno de 50-70% das crianças com NF1 relatando alguma dificuldade de aprendizado (DIGGS-ANDREWS; GUTMANN, 2014; HYMAN; SHORES; NORTH, 2005). Estes resultados endossam estudo prévio deste grupo de pesquisa, no qual foram avaliados testes neuropsicológicos em cinco pacientes idosos do CRNF comparados com 49 controles pareados por idade. Os pacientes com NF1 apresentaram uma piora global do desempenho cognitivo, memória de trabalho verbal e funcionamento visuoespacial (COSTA et al., 2014).

No intuito de se obter uma perspectiva de similaridade entre os sintomas clínicos, foi realizado um dendograma de proximidade representado na **Figura 13**. Este achado sugere que, usualmente, pacientes com MCL também apresentam falsas efélides, algum tipo de neurofibroma e nódulos de Lisch, características mais frequentes na NF1. Pacientes com dificuldade de aprendizado, em geral, apresentaram alterações no discurso, o que pode ter relação com a dificuldade em se expressar devido ao déficit cognitivo apresentado (SCHIRMER; FONTOURA; NUNES, 2004; SUN; WALLACH, 2014). É interessante notar que houve uma relação de proximidade entre histórico familiar e alterações ósseas, o que ainda

não foi relatado na literatura. Portanto, cabe atentar-se para a coincidência desses critérios em amostras maiores a fim de confirmar esta relação.

Com relação aos aspectos genéticos da doença, embora o gene da NF1 tenha sido isolado há mais de 25 anos, muito ainda permanece desconhecido. A fim de contribuir para este campo do conhecimento, neste estudo foram avaliadas a presença de microdeleções no gene *NF1* através da técnica de MLPA, o comprimento relativo dos telômeros, polimorfismos no gene *TERT*, *TNF- α* e *AKT1*, bem como foi realizada uma revisão sistemática e análise *in silico* acerca de miRNAs envolvidos na doença.

Resultados da MLPA possibilitaram a identificação de deleções em apenas 14,58% dos pacientes, sendo três indivíduos PNF assintomático (25%) e quatro TMBNP (30,78%). Não parece haver correlação, portanto, da presença de deleções nestas duas sondas específicas e a malignização do tumor plexiforme, uma vez que as frequências foram bastante similares. Este achado condiz com a dificuldade em se correlacionar o perfil genotípico e o fenotípico na NF1. É curioso notar que, apesar de ser considerada uma doença monogênica, a NF1 apresenta uma grande variedade de fenótipos. Este fato é resultante da diversidade genética, visto que mutações em quaisquer regiões do gene juntamente com a presença de genes modificadores, apesar de levarem à mesma doença, podem influenciar no curso das características clínicas. Assim é que, mesmo em indivíduos com a mesma mutação descrita, o fenótipo não necessariamente será o mesmo.

Outro ponto que vale ressaltar nos achados da MLPA é que somente um dos pacientes com deleção apresenta histórico familiar, o que significa que em 85,7% dos casos ocorreu mutação *de novo*. Neste contexto, a MLPA pode ser útil para as famílias que ainda não sabem o diagnóstico do indivíduo e, dessa forma, podem avaliar a presença de diversas doenças, incluindo a NF1, em apenas um exame. Entretanto, para aqueles indivíduos já diagnosticados através dos critérios clínicos da NF1, não parece ser interessante a realização deste exame para confirmação do diagnóstico, uma vez que somente uma pequena parcela apresentou deleções na MLPA. Além disso, a conduta clínica não será alterada com base nestes resultados.

Posto que a MLPA não nos forneceu informações quanto ao processo de malignização dos tumores plexiformes, foi realizada a busca de outros marcadores moleculares para identificar as diferenças especialmente nos subgrupos da NF1. Há alguns anos, as pesquisas envolvendo biomarcadores cresceram significativamente devido ao avanço das técnicas laboratoriais. Um bom biomarcador pode ser mensurado em bioespécimes, preferencialmente de maneira não-invasiva, e pode ser associado a condições biológicas. Assim, os marcadores

moleculares podem ser identificados em indivíduos susceptíveis, contribuindo para um diagnóstico precoce e melhor intervenção (GALLO et al., 2012).

Uma série de estudos enfatizam o tamanho telomérico correlacionando com diversas condições biológicas, dentre elas envelhecimento, câncer, obesidade, fibrose pulmonar, falência de medula óssea (ARMANIOS, 2009; CALADO; YOUNG, 2012). No entanto, pouco se sabe a respeito dos telômeros na NF1 (JONES et al., 2017; MANTRIPRAGADA et al., 2008; VENTURINI et al., 2012), fato este que justifica a realização deste trabalho.

Já está bem estabelecida a associação entre o encurtamento do telômero e envelhecimento (MÜEZZINLER; ZAINEDDIN; BRENNER, 2013), bem como a presença de telômeros mais alongados em mulheres que em homens (GARDNER et al., 2014), contudo, não foi observada relação aparente entre o comprimento relativo do telômero com idade e sexo na amostra estudada (**Figura 15**). Estudos sugerem que o encurtamento telomérico é mais evidente no primeiro ano de vida e após os 50 anos de idade (AUBERT et al., 2012; CAWTHON et al., 2003) e nossa amostra engloba indivíduos de 5-52 anos, o que pode ter dificultado a constatação desta relação. Adicionalmente, nossos achados endossam dados de Venturini e colaboradores (2012), os quais não encontraram diferenças na atividade da telomerase de acordo com idade e sexo (VENTURINI et al., 2012).

Quando comparados os tamanhos relativos dos telômeros entre indivíduos com NF1 e controles, foi possível notar que aqueles com a doença apresentaram telômeros mais alongados, porém, apesar de uma tendência para telômeros maiores no grupo TMBNP, não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos de NF1. Dois estudos descrevem a reativação da telomerase em amostras de TMBNPs, mas não em PNFs, o que sugere a presença de telômeros maiores naqueles pacientes (MANTRIPRAGADA et al., 2008; VENTURINI et al., 2012). Em contraste, Jones e colaboradores recentemente reportaram telômeros menores em pacientes com TMBNP quando comparados àqueles com PNFs e neurofibromas cutâneos (JONES et al., 2017). Uma possível explicação para tal discordância é a hipótese do papel dual do comprimento telomérico na carcinogênese (ZHU et al., 2016). Alguns autores defendem a ideia de que telômeros mais curtos levam à instabilidade genômica e podem iniciar o processo da carcinogênese (WU et al., 2003), ao passo que telômeros mais longos favorecem mais divisões celulares, aumentando, assim, as chances de anormalidades celulares (CESARE; REDDEL, 2010; MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017). Portanto, mais estudos são necessários com um maior número amostral para elucidar a relação do comprimento telomérico e o processo da malignização dos tumores plexiformes na NF1. Seria interessante ainda fazer a correlação entre o comprimento telomérico em amostras

de tecido e de sangue periférico, a fim de constatar até que ponto os telômeros leucocitários correspondem à malignização dos PNFs.

No que se refere às análises de polimorfismos, todos os SNPs encontraram-se em EHW, à exceção do rs2853669 (*TERT*) e rs1800629 (*TNF- α*). O EHW postula que, se não existirem fatores evolutivos atuando sobre uma população, as frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genótípicas atingem um equilíbrio estável ao longo das gerações (BEIGUELMAN, 2008; MAYO, 2008). Os fatores que podem alterar o EHW incluem os casamentos consanguíneos, surgimento de novas mutações, migrações, seleção natural e deriva genética (ORTIZ; STAVROULAKIS, 2001; ZINTZARAS, 2010). Os desvios no EHW encontrados neste estudo podem ser atribuídos à estratificação da população, viés de seleção de amostra ou a erros de genotipagem (ZINTZARAS, 2008, 2010). A estratificação populacional inclui diferenças entre grupos de origens étnicas distintas ou diferenças entre grupos de origem étnica similar, mas com limitada mistura racial (WITTKE-THOMPSON; PLUZHNIKOV; COX, 2005). Neste estudo, não foi avaliada a origem étnica dos indivíduos e, além disso, a coleta ocorreu apenas em Belo Horizonte, sendo que a maioria dos pacientes eram residentes na região. Portanto, a hipótese do viés de seleção amostral parece ser bastante plausível neste trabalho. A estratificação populacional pode ser também o motivo pelo qual três SNPs (rs2853669, rs1800629 e rs3803304) apresentaram MAFs distintas da MAF global, uma vez que a população brasileira apresenta um alto grau de miscigenação e, até o momento, não há evidências disponíveis no 1000 Genomes que retratem o perfil dos polimorfismos estudados nessa população. Ademais, os desvios do EHW comumente são relacionados a erros laboratoriais, visto que ainda há a possibilidade de que esse ensaio seja altamente preciso (10 % das amostras foram genotipadas duas vezes e nenhuma disparidade foi encontrada — replicatas concordantes), porém com algum viés de exatidão (resultado discordante do resultado real).

A literatura propõe que o aumento do comprimento telomérico está relacionado com a reativação da telomerase (CHEN; CHEN, 2011) e acredita-se que os níveis de ativação desta enzima sejam influenciados por polimorfismos no gene *TERT* (AKINCILAR; UNAL; TERGAONKAR, 2016). Neste contexto, para verificar se indivíduos com NF1, especialmente aqueles com TMBNP, possuem mutações em *TERT* que contribuem para a reativação da telomerase, pacientes e controles foram genotipados para três polimorfismos neste gene (rs10069690, rs2853669, rs2736100). Embora estudos prévios tenham relatado que esses SNPs estão intimamente relacionados com a reativação da telomerase em diversos tipos de câncer (BATISTA et al., 2016; BELL et al., 2016; MOSRATI et al., 2015; YANG et al., 2015; ZOU et al., 2012), não foram encontradas diferenças significativas nas frequências

genotípicas de casos e controles neste estudo. Entretanto, quando avaliados os modelos genéticos para os subgrupos da NF1 no contexto da malignização (PNF versus TMBNP), o rs10069690 mostrou-se significativo, sendo o modelo de dominância o mais apropriado, com AIC = 57,6 (**Tabela 9**). O critério de informação de Akaike (AIC) é uma técnica baseada no ajuste da amostra ao modelo estatístico utilizado. Um bom modelo é aquele que tem o menor AIC entre todos os outros modelos (AKAIKE, 1998), por isso, o melhor modelo foi o de dominância. Esses resultados sugerem que indivíduos com o alelo T apresentam uma chance consideravelmente maior (RC = 10,33) de malignizar quando comparados àqueles homocigotos para o alelo C. Esses achados corroboram o trabalho de Mosrati e colaboradores que observaram uma forte associação do alelo T e o aumento do risco de desenvolvimento de glioblastoma primário (MOSRATI et al., 2015).

Quanto aos demais SNPs de *TERT*, não foram observadas estatísticas significativas nos modelos genéticos avaliados (**Tabela 9**). As frequências nos subgrupos de NF1 para o polimorfismo rs2853669 foram bastante similares, o que corrobora dados de recente meta-análise em que não foram encontradas evidências de que este polimorfismo possa alterar os riscos para surgimento de cânceres ou para melhora/ piora do prognóstico (SHEN et al., 2017). Em contraste, alguns estudos observaram um impacto deste polimorfismo no prognóstico de câncer de bexiga (RACHAKONDA et al., 2013; SPIEGL-KREINECKER et al., 2015), entretanto, o desfecho clínico e origem étnica (Suécia e Áustria, respectivamente) diferentes parecem contribuir para a associação observada. Por fim, o rs2736100 também não demonstrou diferenças significativas nas frequências genotípicas na amostra deste estudo, apesar deste SNP ser relatado como um possível fator de risco para glioma, adenocarcinoma e câncer de bexiga e de pulmão (MCKAY et al., 2008; WANG; ZHANG; JIN, 2013; ZOU et al., 2012). Assim, os SNPs para *TERT* aqui avaliados não influenciam o risco de malignização em pacientes com NF1, ainda que alguns estudos demonstrem a importância dos mesmos em determinados tipos de câncer.

Quando comparados os modelos genéticos para *TERT* e o comprimento relativo dos telômeros, também não foram encontradas associações significativas (**Tabela 10**). Isto sugere que os polimorfismos estudados não influenciam no comprimento relativo telomérico e, portanto, não podem ser utilizados como indicativo indireto da atividade da telomerase. Não obstante os resultados obtidos, não podemos descartar a hipótese da reativação da telomerase. Há ainda a possibilidade de reativação local, somente no microambiente tumoral, portanto, seria interessante a realização de novos estudos propondo não só a mensuração do comprimento telomérico em sangue periférico e em tecido, como também a avaliação direta da atividade da telomerase.

Em suma, esses dados sugerem que o comprimento relativo dos telômeros não é um bom marcador molecular para diagnóstico da NF1 e nem para predição do processo de malignização do tumor plexiforme, haja vista que há sobreposição dos comprimentos teloméricos entre casos e controles e PNFs e TMBNP. Parte da ausência de diferenças significativas pode ser justificada por algumas limitações deste trabalho, tais como: pequena amostragem, desenho retrospectivo e transversal do estudo e a ausência de um controle com relação ao estilo de vida, uma vez que os telômeros podem variar de tamanho devido a uma série de fatores como tabagismo, etilismo, dieta (SHAMMAS, 2011).

Os haplótipos são combinações particulares de alelos herdadas em uma população, sem uma taxa de recombinação substancial (GABRIEL et al., 2002). Neste trabalho, apesar da ausência de um forte LD, foram descritos oito blocos haplotípicos: três quando comparados casos e controles (**Tabela 8**) e cinco quando analisados os perfis de malignização do tumor plexiforme (PNF x TMBNP) (**Tabela 12**). Destes, cabe destacar os haplótipos C-T (rs10069690 e rs2853669, respectivamente) (RC = 5,14) e C-T-G (rs10069690, rs2853669 e rs2736100, respectivamente) (RC = 8,01), que apresentaram uma maior frequência em indivíduos com TMBNP (**Tabela 12**). Isso implica dizer que quando há presença do alelo C no rs10069690, por exemplo, usualmente há o alelo T no rs2853669 em indivíduos com TMBNP, assim, sugere-se que essa combinação haplotípica possa ser considerada um fator de risco para a malignização do tumor. Até o momento, ainda não foram descritos haplótipos em *TERT* em indivíduos com NF1, e, portanto, esses achados nos levam a atentar para esse perfil haplotípico nesses pacientes, o qual pode fornecer indícios para um maior risco de malignização.

A literatura propõe que genes modificadores possam agir na NF1 contribuindo para a variabilidade dos fenótipos observados (YANG et al., 2018). No intuito de identificar se *TNF- α* e *AKT1* poderiam se comportar como genes modificadores na doença, foi realizada a genotipagem de três polimorfismos (TNF_rs1800629, AKT_1130214 e AKT_3803304) em pacientes com NF1. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que pode ser produzida tanto por células inflamatórias quanto malignas e, portanto, desempenha um importante papel na carcinogênese e progressão de tumores (BALKWILL, 2009; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016; WAJANT, 2009). Estudos, inclusive do nosso grupo de pesquisa, demonstram que os níveis de TNF- α estão aumentados em células TCD8⁺ de pacientes com NF1 quando comparados a indivíduos controles (FARSCHTSCHI et al., 2016; PARK et al., 2013; TORRES et al., 2016), o que nos levou a avaliar o perfil genético do *TNF- α* na nossa amostra. Os modelos genéticos gerados para o rs1800629 não demonstraram associação significativa do SNP com o perfil de malignização dos tumores plexiformes (**Tabela 11**). Apesar de controverso, este achado não

determina os níveis de TNF- α na amostra, visto que apenas um polimorfismo foi analisado. Esse resultado sugere que o rs1800629 não corresponde aos níveis de TNF- α nos pacientes com NF1 e também não contribui para o perfil de malignização dos PNFs, o que corrobora achados prévios nos quais foi observado que níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , independem do estágio do tumor na NF1 (FARSCHTSCHI et al., 2016; PARK et al., 2013).

A via do fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) – Akt é uma das principais vias de transdução de sinais que regula funções como crescimento celular, proliferação e migração celular, metabolismo e sobrevivência (MANNING; TOKER, 2017; MAYER; ARTEAGA, 2016). Mutações nesta via já foram amplamente associadas à predisposição ao desenvolvimento de cânceres (MARTINI et al., 2014; MAYER; ARTEAGA, 2016) e, evidências sugerem que ela possa estar alterada em pacientes com NF1 (YANG et al., 2018). Diversos estudos apontam para a correlação dos SNPs rs1130214 e rs3803304 com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres como bexiga, pulmão, próstata, mama (BIZHANI et al., 2018; KIM et al., 2012; LE RHUN et al., 2017; LIU et al., 2017; PU et al., 2011). No entanto, não foi observada correlação destes polimorfismos com a malignização do tumor plexiforme neste trabalho. Apesar disso, o limitado tamanho amostral, as diferentes origens étnicas e os tipos de câncer avaliados podem ter contribuído para a falta de associação observada.

Uma métrica bastante utilizada para predição de fenótipos é o modelo poligênico. Este modelo agrega o efeito de diversas variantes genéticas em um único *score* preditivo, assim, mesmo que o SNP em si não apresente um efeito significativo, quando combinado a outros SNPs, ele pode ter um efeito aditivo e contribuir para o desenvolvimento da doença (DUDBRIDGE, 2013). O modelo poligênico para os polimorfismos rs10069690 (*TERT*), rs1800629 (*TNF- α*) e rs1130214 (*AKT1*) do presente trabalho não demonstrou evidência suficiente para contribuir com processo de malignização nos pacientes com NF1, sugerindo que mesmo avaliados juntos, estes SNPs não apresentam um efeito aditivo na malignização do tumor plexiforme.

Além do comprimento relativo dos telômeros e da genotipagem de polimorfismos, outro biomarcador extensamente estudado é o perfil de miRNAs. Neste contexto, este trabalho descreveu os principais miRNAs encontrados em pacientes com NF1. Notavelmente, há uma grande variabilidade entre os miRNAs descritos, sendo que apenas oito foram encontrados em mais de um estudo (**Tabela 14** e **Tabela 15**). Uma hipótese para tal heterogeneidade de dados baseia-se no aspecto transiente dos miRNAs, considerando-se que estas moléculas podem ter seus níveis de expressão alterados por uma série de razões, entre elas sexo, dieta, medicamentos, hábitos tabagistas, estresse e doenças (SHARMA; EGHBALI, 2014;

TARALLO et al., 2014; WAHID; KHAN; KIM, 2014). Assim, a amostra estudada deve ser cuidadosamente selecionada, com rigorosos critérios de inclusão e exclusão, a fim de evitar este tipo de viés. Além disso, tamanho amostral, tipo de amostra biológica, metodologia e análise estatística possuem um importante papel na determinação de obtenção resultados confiáveis (BLEAZARD; LAMB; GRIFFITHS-JONES, 2014; BUSCHMANN et al., 2016; WITWER, 2015; ZHANG et al., 2014b). Para minimizar essa variabilidade, von Elm e colaboradores propuseram, em 2007, uma ferramenta denominada STROBE-ME (do inglês, *STrengthening Reporting of OBservational studies in Epidemiology for Molecular Epidemiology*), a qual disponibiliza um guia sobre como devem ser reportados os dados em estudos de epidemiologia molecular (VON ELM et al., 2007). Dentre os aspectos mencionados estão: coleta, armazenamento e processamento da amostra biológica e métodos laboratoriais para análise (GALLO et al., 2012; VON ELM et al., 2007).

Lévy e colaboradores (2004) também estudaram o perfil molecular dos TMBNPs através da qRT-PCR e reportaram um aumento na expressão de alguns genes quando comparados a amostras de PNFs. Destacam-se aqui genes envolvidos na proliferação celular (*MKI67, TOP2A, CCNE2*), apoptose (*BIRC5/Survivin, TP73*), fatores de crescimento (*SPP1, CXCL5, OSF-2, EPHA7*), fatores de transcrição (*FOXM1, FOXA2/HNF3B*) e senescência (*TERT, TERC/hTR*) (LÉVY et al., 2004). Adicionalmente, *TERT* e *TERC/hTR* são genes relacionados à dinâmica da replicação dos telômeros e encontram-se inativos nas células somáticas. Contudo, estudos relatam que estes genes tornam-se transcricionalmente ativos em vários tipos de câncer (CHEN; CHEN, 2011; MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017). De fato, apesar de não mensurada diretamente a atividade da telomerase, nossos dados demonstram que o comprimento relativo dos telômeros é maior em pacientes com NF1, sugerindo que a telomerase possa estar ativa nas células tumorais destes indivíduos.

Uma vez que um miRNAs pode regular e ser regulado por diversos genes, foram investigados os processos biológicos envolvidos na patogênese da NF1 em lugar dos genes especificamente. Como visto, quatro grupos foram formados, contemplando vias relacionadas a diferenciação e sinalização celular, modificação pós-traducional, regulação de processos metabólicos e regulação da transcrição (**Figura 19** e Apêndice 9.3). Dentre estas, vias relacionadas ao metabolismo proteico e lipídico e transdução de sinais foram mais prevalentes (ver Apêndice 9.2). Estes dados corroboram Subramanian e colaboradores (2010) que identificaram vias de sinalização alteradas em amostras de TMBNP muito similares àquelas encontradas neste trabalho (SUBRAMANIAN et al., 2010). Tais processos biológicos aqui mencionados apresentam uma relação muito próxima com a neurofibromina, especialmente

transporte transmembrana, transporte transmembrana de íons acoplado a hidrólise de ATP, regulação da GTPase e metabolismo lipídico (Apêndice 9.2).

A neurofibromina, proteína que regula negativamente a via RAS-MAPK, apresenta dois domínios principais: SEC14, encontrado em proteínas secretórias e proteínas reguladas por lipídios, e o domínio Ras-GTPase, que inativa RAS por acelerar a conversão da forma ativa RAS-GTP para a forma inativa RAS-GDP (TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). Mutações no gene *NF1* que afetam a função Ras-GTPase são as principais razões para o desenvolvimento das características clínicas da doença. Além disso, a neurofibromina regula ainda o crescimento celular através da modulação do sinalizador secundário AMP cíclico (cAMP) de maneira ATP dependente (RATNER; MILLER, 2015; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). De fato, estudos em células de Schwann de modelos animais e TMBNPs humanos com ausência da neurofibromina apresentaram aumento nos níveis de cAMP (KIM et al., 2001; RATNER; MILLER, 2015). Assim, a neurofibromina pode afetar indiretamente diversos alvos relacionados à sobrevivência celular através da regulação deste sinalizador secundário. Além disso, a neurofibromina possui uma gama de interações com proteínas e fosfolipídeos envolvidos em diversos processos, incluindo tráfico celular, diferenciação neuronal, localização na membrana, remodelamento do citoesqueleto de actina, ubiquitinação, adesão celular e sinalização celular através de RAS (RATNER; MILLER, 2015).

Em suma, os achados aqui demonstrados contribuem para a elucidação dos principais miRNAs encontrados na *NF1* e das vias biológicas envolvidas na patologia da doença. Além disso, este trabalho reforça a ideia de que os miRNAs são uma importante ferramenta como marcadores moleculares para diagnóstico precoce da malignização dos PNFs, bem como para determinação de possíveis alvos para desenvolvimento de drogas terapêuticas (GUTMANN et al., 2017; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). Contudo, mais pesquisas são necessárias a fim de encontrar um consenso entre os miRNAs encontrados, para que kits diagnósticos acessíveis à população possam ser desenvolvidos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a coincidência de algumas manifestações clínicas como MCL, falsas efélides, neurofibromas e nódulos de Lisch, bem como dificuldade de aprendizado e alterações na fala de uma forma não antes retratada na literatura. A proximidade do histórico familiar e de alterações ósseas foi um achado interessante e cabe o acompanhamento de um maior grupo de pacientes para a confirmação do mesmo.

Com relação aos aspectos moleculares, este trabalho obteve as seguintes conclusões:

- A MLPA foi capaz de identificar deleções em apenas 14,58% dos pacientes, podendo ser útil, portanto, para as famílias que ainda não sabem o diagnóstico do indivíduo e podem, assim, avaliar a presença de diversas doenças, incluindo a NF1, em apenas um exame.
- Indivíduos com NF1 apresentaram telômeros mais longos quando comparados aos controles, contudo, não houve diferença entre os grupos PNF assintomático, PNF sintomático e TMBNP. Portanto, o comprimento relativo dos telômeros não fornece informações suficientes quanto ao processo de malignização dos PNFs.
- O polimorfismo rs10069690 de *TERT* foi o único que apresentou uma associação significativa com a malignização do tumor plexiforme, com um maior risco para indivíduos portadores do alelo T. Contudo, mais replicações são necessárias para confirmação desse achado.
- O modelo poligênico de *TERT*, *TNF- α* e *AKT1* não é informativo quanto ao perfil de malignização do tumor plexiforme.
- A revisão sistemática demonstrou a grande heterogeneidade de miRNAs em NF1 descritos na literatura, dificultando a sua utilização como biomarcadores para o processo de malignização. Com a análise *in silico*, foi possível identificar as principais vias biológicas envolvidas na patogênese da NF1. São elas: sinalização célula-célula, regulação da transcrição e de processos pós-transcricionais, modificações pós-traducionais, modificações de histonas, ativação da via MAPK, apoptose, regulação da neurogênese, angiogênese e crescimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: PARZEN, E.; TANABE, K.; KITAGAWA, G. (Eds.). . **Selected Papers of Hirotugu Akaike. Springer Series in Statistics (Perspectives in Statistics)**. [s.l.] Springer, New York, NY, 1998. p. 199–213.

AKINCILAR, S. C.; UNAL, B.; TERGAONKAR, V. Reactivation of telomerase in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1659–1670, 2016.

ARDLIE, K. G.; LUNETTA, K. L.; SEIELSTAD, M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 2, p. 304–11, 2002.

ARMANIOS, M. Syndromes of Telomere Shortening. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, n. 1, p. 45–61, set. 2009.

ARS, E. et al. **Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients** **Journal of Medical Genetics**. [s.l: s.n.].

AUBERT, G. et al. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. **PLoS genetics**, v. 8, n. 5, p. e1002696, 2012.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 2009.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BATISTA, P. B. et al. Avaliação do processamento auditivo na Neurofibromatose tipo 1. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, p. 604–608, 2010.

BATISTA, P. B. et al. Auditory temporal processing deficits and language disorders in patients with neurofibromatosis type 1. **Journal of Communication Disorders**, v. 48, n. 1, p. 18–26, 2014.

BATISTA, R. et al. The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 2, p. 414–423, 2016.

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (SBG), 2008.

BELL, R. J. A. et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. **Molecular Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. 315–323, 2016.

BEN-SHACHAR, S. et al. Increased rate of missense/in-frame mutations in individuals with NF1-related pulmonary stenosis: A novel genotype-phenotype correlation. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 5, p. 535–539, 2013.

BIZHANI, F. et al. ASSOCIATION BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE PI3K / AKT / MTOR PATHWAY AND. p. 3–13, 2018.

BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS letters**, v. 579, n. 4, p. 859–62, 2005.

BLACKBURN, E. H.; SZOSTAK, J. W.; GREIDER, C. W. **Maintenance of chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/advanced-medicineprize2009.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BLEAZARD, T.; LAMB, J. A.; GRIFFITHS-JONES, S. Bias in microRNA functional enrichment analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1592–1598, 2014.

BOULAY, J. L. et al. Gene dosage by quantitative real-time PCR. **BioTechniques**, v. 27, n. 2, p. 228–30, 232, 1999.

BOYD, K. P.; KORF, B. R.; THEOS, A. Neurofibromatosis type 1. **Journal of American Dermatology**, v. 61, n. 1, p. 1–14, 2009.

BREMS, H. et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. **Nature genetics**, v. 39, n. 9, p. 1120–1126, 2007.

BREMS, H. et al. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 508–515, maio 2009.

BREMS, H. et al. Review and update of SPRED1 mutations causing legius syndrome. **Human Mutation**, v. 33, n. 11, p. 1538–1546, 2012.

BUSCHMANN, D. et al. Toward reliable biomarker signatures in the age of liquid biopsies - how to standardize the small RNA-Seq workflow. **Nucleic Acids Research**, n. 6, p. gkw545, 2016.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–2365, 10 dez. 2009.

CALADO, R.; YOUNG, N. Telomeres in disease. **F1000 Medicine Reports**, v. 4, n. April, p. 8, 2 abr. 2012.

CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2999–3004, 2004.

CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. **International Journal of Molecular Sciences**,

v. 17, n. 10, 2016.

CAWTHON, R. et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. **The Lancet**, v. 361, n. 9355, p. 393–395, 2003.

CAWTHON, R. M. et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. **Cell**, v. 62, n. 1, p. 193–201, 1990.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 10, p. e47, 2002.

CESARE, A. J.; REDDEL, R. R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 5, p. 319–330, 2010.

CHAI, G. et al. MicroRNA-10b regulates tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, 2010.

CHEN, C.-H.; CHEN, R.-J. Prevalence of telomerase activity in human cancer. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 5, p. 275–89, 2011.

CHOU, C. H. et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D296–D302, 2018.

CLARK, M. A. et al. Soft-Tissue Sarcomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 7, p. 701–711, 2005.

COSTA, D. D. S. et al. Neuropsychological impairments in elderly Neurofibromatosis type 1 patients. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 5, p. 216–219, 2014.

CRNF, C. DE R. EM N. **O QUE SÃO AS NEUROFIBROMATOSES? NF Tipo 1 - Manual para pacientes, familiares e profissionais da área da saúde.**

DE LA CRUZ, O.; RASKA, P. Population structure at different minor allele frequency levels. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 1, p. S55, 2014.

DEVLIN, C. et al. MiR-210: More than a silent player in hypoxia. **IUBMB Life**, v. 63, n. 2, p. 94–100, 2011.

DIGGS-ANDREWS, K. A.; GUTMANN, D. Modeling cognitive Dysfunction in Neurofibromatosis type 1. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 4, p. 237–247, 2014.

DIOGO, C. DE J. et al. Tumor maligno da bainha do nervo periférico Relato de caso * Malignant peripheral nerve sheath tumor . Case report. v. 10, n. 1, p. 69–72, 2012.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, 2003.

DUDBRIDGE, F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. **Human Heredity**, v. 66, n. 2, p. 87–98, 2008.

DUDBRIDGE, F. Power and Predictive Accuracy of Polygenic Risk Scores. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, 2013.

EASTON, D. F. et al. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. **American journal of human genetics**, v. 53, n. Nf I, p. 305–313, 1993.

ETHERIDGE, A. et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 85–90, dez. 2011.

EVANS, D. et al. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, p. 311–314, 28 jan. 2002.

FARIA, L. P. G. et al. Prevalência de um fenótipo inédito na Neurofibromatose do Tipo 1 – Dados preliminares. v. 22, n. 4, p. 363–368, 2012.

FARSCHTSCHI, S. et al. Effector T cell subclasses associate with tumor burden in neurofibromatosis type 1 patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1113–1121, 2016.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–358, 2011.

FERNER, R. E. et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. **Journal of medical genetics**, v. 44, n. 2, p. 81–88, 2007.

FERNER, R. E. et al. [18F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG PET) as a diagnostic tool for neurofibromatosis 1 (NF1) associated malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs): a long-term clinical study. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 2, p. 390–394, 10 jan. 2008.

FERNER, R. E.; GUTMANN, D. H. International Consensus Statement on Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis 1 International Consensus Statement on Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis 1 1. **American association for cancer research**, n. 13, p. 1573–1577, 2002.

FORBES, S. A. et al. COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2011.

FRIEDMAN, J. M. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. **American journal of medical genetics**, v. 89, n. 1, p. 1–6, 1999.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

FUKUSHIMA, S. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is a poor prognostic factor and potential therapeutic target in malignant peripheral nerve sheath tumor. p. 1–19, 2017.

GABRIEL, S. B. et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 2002.

GALLO, V. et al. Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology - Molecular Epidemiology (STROBE-ME): An extension of the STROBE statement. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 1, p. 1–16, jan. 2012.

GARDNER, M. et al. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. **Experimental Gerontology**, v. 51, p. 15–27, 2014.

GHOSH, A.; TALWAR, O. P.; PRADHAN, S. V. Tumour and tumour-like conditions of peripheral nerve origin: Ten years' experience. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 8, n. 29, p. 97–101, 2010.

GONG, M. et al. MicroRNA-204 critically regulates carcinogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumors. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 8, p. 1007–1017, ago. 2012.

GUTMANN, D. H. et al. Neurofibromatosis type 1. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17004, 2017.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature*, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342578>>

HASHIMOTO, Y.; AKIYAMA, Y.; YUASA, Y. Multiple-to-Multiple Relationships between MicroRNAs and Target Genes in Gastric Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460–469, 2014.

HEAPHY, C. M.; MEEKER, A. K. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 6, p. 1227–1238, jun. 2011.

HIRBE, A. C.; GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis type 1: A multidisciplinary approach to care. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 8, p. 834–843, 2014.

HYMAN, S. L.; SHORES, A.; NORTH, K. N. The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. **Neurology**, v. 65, n. 7, p. 1037–44, 11 out. 2005.

ITANI, S. et al. MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 138, n. 9, p. 1501–1509, 2012.

JETT, K.; FRIEDMAN, J. M. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. v. 12, n. 1, p. 1–11, 2010.

JONES, R. E. et al. Telomere erosion in NF1 tumorigenesis. v. 8, n. 25, p. 40132–40139, 2017.

JOUHILAHTI, E. M. et al. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. **American Journal**

of Pathology, v. 178, n. 5, p. 1932–1939, 2011.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2016.

KIM, H. A et al. Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediated by cyclin D1. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 1110–1116, 2001.

KIM, M. J. et al. *AKT 1* polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 105, n. 2, p. 167–174, 2012.

KIM, N. W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5193, p. 2011–2015, 1994.

KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 289–320, 2007.

LAHIRI, D. K.; SCHNABEL, B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. **Biochemical Genetics**, v. 31, p. 321–328, 1993.

LE RHUN, E. et al. Identification of single nucleotide polymorphisms of the PI3K-AKT-mTOR pathway as a risk factor of central nervous system metastasis in metastatic breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 87, p. 189–198, dez. 2017.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. v. 75, p. 843–854, 1993.

LÉVY, P. et al. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. **Molecular Cancer**, v. 3, p. 1–13, 2004.

LI, W. H.; SADLER, L. A. Low nucleotide diversity in man. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 513–523, 1991.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature Review Cancer**, v. 15, n. 6, p. 321–333, 2015.

LIN, T. T. et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of a human malignancy. **Blood**, v. 44, n. 0, p. 1899–1908, 2010.

LIU, J. M. et al. Association between single nucleotide polymorphisms in *AKT1* and the risk of prostate cancer in the Chinese Han population. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 30 mar. 2017.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834–838, 2005.

MACIEJOWSKI, J.; DE LANGE, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and

- genome instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 3, p. 175–186, 2017.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.
- MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.
- MANTRIPRAGADA, K. et al. Telomerase Activity is a Biomarker for High Grade Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis Type 1 Individuals. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 47, p. 238–246, 2008.
- MARTÍNEZ, M. et al. Gene signature associated with benign neurofibroma transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors. p. 1–27, 2017.
- MARTINI, M. et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. **Annals of Medicine**, v. 46, n. 6, p. 372–383, 2014.
- MARTINS, A. S. et al. Lower fasting blood glucose in neurofibromatosis type 1. **Endocrine connections**, v. 3500, n. 1, p. 4–9, 2015.
- MASLIAH-PLANCHON, J. et al. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. **BMC genomics**, v. 14, p. 473, 2013.
- MASOCCO, M. et al. Mortality associated with neurofibromatosis type 1: a study based on Italian death certificates (1995-2006). **Orphanet journal of rare diseases**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.
- MAYER, I. A.; ARTEAGA, C. L. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. **Annual Review of Medicine**, v. 67, n. 1, p. 11–28, 2016.
- MAYO, O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. **Twin Research and Human Genetics**, v. 11, n. 3, p. 249–256, 2008.
- MCKAY, J. D. et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1404–1406, 2008.
- MIRACCO, E. J. et al. Progress in structural studies of telomerase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 24, n. 1, p. 115–124, 2014.
- MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 62, n. 10, p. 1006–1012, out. 2009.
- MORRIS, J. H. et al. clusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for Cytoscape. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 436, 2011.
- MOSRATI, M. A. et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic

factors in primary glioblastoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, 2015.

MÜEZZINLER, A.; ZAINEDDIN, A. K.; BRENNER, H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 509–519, 2013.

NIH CONSENSUS STATEMENT ONLINE. **Neurofibromatosis**. Consensus Development Conference Statement. **Anais...**1988

NORDLUND, M. et al. Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 1588–600, abr. 1993.

ORTIZ, M. T.; STAVROULAKIS, A. M. The Hardy-Weinberg Equilibrium — Some Helpful Suggestions. **Nature**, v. 62, n. 1, p. 20–22, 2001.

PARK, S.-J. et al. Serum biomarkers for neurofibromatosis type 1 and early detection of malignant peripheral nerve-sheath tumors. **BMC medicine**, v. 11, p. 109, 2013.

PARRINELLO, S.; LLOYD, A. C. Neurofibroma development in NF1--insights into tumour initiation. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 8, p. 395–403, 2009.

PASCHOU, M.; DOXAKIS, E. Neurofibromin 1 is a miRNA target in neurons. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46773, 2012.

PASMANT, E. et al. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. **Human mutation**, v. 31, n. 6, p. E1506-18, 2010.

PASMANT, E. et al. Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. **Journal of medical genetics**, v. 49, n. 8, p. 483–9, 2012.

PASMANT, E. et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 5, p. 596–601, 30 maio 2015.

PRATHER, A. A. et al. Tired telomeres: Poor global sleep quality, perceived stress, and telomere length in immune cell subsets in obese men and women. **Brain, behavior, and immunity**, v. 47, p. 155–162, 2015.

PRESNEAU, N. et al. MicroRNA profiling of peripheral nerve sheath tumours identifies miR-29c as a tumour suppressor gene involved in tumour progression. **British journal of cancer**, v. 108, n. 4, p. 964–72, 2013.

PU, X. et al. PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variation predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 71, n. 1, p. 82–88, 2011.

RACHAKONDA, P. S. et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17426–17431, 2013.

RANA, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 1, p. 23–36, 2007.

RASMUSSEN, S. A; YANG, Q.; FRIEDMAN, J. M. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. **American journal of human genetics**, v. 68, n. Imaizumi 1995, p. 1110–1118, 2001.

RATNER, N.; MILLER, S. J. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 290–301, 2015.

RAUEN, K. A. The RASopathies. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 14, p. 355–69, 2013.

REINHOLZ, M. M. et al. Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 3, p. 267–277, 2009.

REYNOLDS, R. M. et al. **Von Recklinghausen's neurofibromatosis : neurofibromatosis type 1**The Lancet, 2003.

RICCARDI, V. M. NF1 Clinical Elements and The NF1 Neurofibroma Burden. **Jacobs Journal of Neurology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2016.

RODRIGUES, L. O. C. et al. Neurofibromatoses: part 1 - diagnosis and differential diagnosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 72, n. 3, p. 241–250, 2014.

RODRIGUEZ, F. J. et al. Pathology of peripheral nerve sheath tumors: Diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 3, p. 295–319, 2012.

ROJNUEANGNIT, K. et al. High Incidence of Noonan Syndrome Features Including Short Stature and Pulmonic Stenosis in Patients carrying NF1 Missense Mutations Affecting p.Arg1809: Genotype-Phenotype Correlation. **Human Mutation**, v. 36, n. 11, p. 1052–1063, 2015.

ROSENFELD, N. et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 462–469, 23 abr. 2008.

SABBAGH, A. et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 15, p. 2768–2778, 1 ago. 2009.

SABBAGH, A. et al. NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type i genotype-phenotype correlation: The french experience. **Human Mutation**, v. 34, n. 11, p. 1510–1518, 2013.

SALAZAR, G. C. **Contribuição das microdeleções/microduplicações intersticiais para o fenótipo dificuldade de aprendizagem na Matemática.** [s.l.] Universidade Federal

de Minas Gerais, 2013.

SAYED, D.; ABDELLATIF, M. MicroRNAs in Development and Disease. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 827–887, 2011.

SCHIRMER, C. R.; FONTOURA, D. R.; NUNES, M. L. Language and learning disorders. p. 95–103, 2004.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.

SEDANI, A.; COOPER, D. N.; UPADHYAYA, M. An emerging role for microRNAs in NF1 tumorigenesis. **Human Genomics**, v. 6, n. 1, p. 23, 2012.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 1, p. 28–34, 2011.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, n. 13, p. 2498–2504, 2003.

SHARMA, S.; EGHBALI, M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. **Biology of Sex Differences**, v. 5, n. 1, p. 3, 2014.

SHAY, J. W.; BACCHETTI S. **A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer** *European Journal of Cancer*, 1997.

SHEN, N. et al. Association between rs2853669 in *TERT* gene and the risk and prognosis of human cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, p. 50864–50872, 2017.

SHIN, C. et al. Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing. **Molecular Cell**, v. 38, n. 6, p. 789–802, 2010.

SOUZA, J. F. DE et al. Neurofibromatose tipo 1: mais comum e grave do que se imagina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 4, p. 394–399, 2009a.

SOUZA, J. F. DE. **A aptidão física está comprometida na neurofibromatose tipo 1, mesmo nas formas de menor gravidade**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

SOUZA, J. F. DE et al. Exercise capacity impairment in individuals with neurofibromatosis type 1. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 161, n. 2, p. 393–395, fev. 2013.

SOUZA, M. L. DE et al. Nutrient intake in neurofibromatosis type 1: A cross-sectional study. **Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 858–862, 2015.

SOUZA, J. F. et al. Muscular force is reduced in neurofibromatosis type 1. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 9, n. 1, p. 15–17, 2009b.

SPIEGL-KREINECKER, S. et al. Prognostic quality of activating TERT promoter mutations in glioblastoma: Interaction with the rs2853669 polymorphism and patient age at diagnosis. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 9, p. 1231–1240, 2015.

SPURLOCK, G. et al. Molecular evolution of a neurofibroma to malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) in an NF1 patient: Correlation between histopathological, clinical and molecular findings. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 12, p. 1869–1880, 2010.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010.

STUCKY, C.-C. H. et al. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST): The Mayo Clinic Experience. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 878–885, 2012.

SUBRAMANIAN, S. et al. Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours. n. October 2009, p. 58–70, 2010.

SUN, L.; WALLACH, G. P. Language disorders are learning disabilities: Challenges on the divergent and diverse paths to language learning disability. **Topics in Language Disorders**, v. 34, n. 1, p. 25–38, 2014.

SUPEK, F. et al. Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

SZUDEK, J.; JOE, H.; FRIEDMAN, J. M. Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1). **Genetic Epidemiology**, v. 23, n. 2, p. 150–164, 2002.

TABANGIN, M. E.; WOO, J. G.; MARTIN, L. J. The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. **BMC Proceedings**, v. 3, n. Suppl 7, p. S41, 2009.

TARALLO, S. et al. MicroRNA expression in relation to different dietary habits: A comparison in stool and plasma samples. **Mutagenesis**, v. 29, n. 5, p. 385–391, 2014.

TIDYMAN, W. E.; RAUEN, K. A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 3, p. 230–6, 2009.

TORRES, K. C. L. et al. Immune markers in the RASopathy neurofibromatosis type 1. **Journal of Neuroimmunology**, v. 295–296, p. 122–129, 2016.

TOVMASSIAN, D.; ABDUL RAZAK, M.; LONDON, K. The Role of [18 F]FDG-PET/CT in Predicting Malignant Transformation of Plexiform Neurofibromas in Neurofibromatosis-1. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2016, n. Article ID 6162182, p. 1–7, 2016.

TROVÓ-MARQUI, A. B.; TAJARA, E. H. Neurofibromin: A general outlook. **Clinical Genetics**, v. 70, n. 1, p. 1–13, 2006.

UHLMANN, E. J.; PLOTKIN, S. R. Neurofibromatoses. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology. Neurodegenerative Diseases**. [s.l: s.n.]. v. 724p. 266–77.

UPADHYAYA, M. et al. An Absence of Cutaneous Neurofibromas Associated with a 3-bp Inframe Deletion in Exon 17 of the NF1 Gene (c.2970-2972 delAAT): Evidence of a Clinically Significant NF1 Genotype-Phenotype Correlation. **Am J Hum Genet**, v. 80, n. 1, p. 140–151, 2007.

UPADHYAYA, M. et al. Germline and Somatic NF1 Gene Mutation Spectrum in NF1-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNSTs). **Human Mutation**, v. 29, p. 74–82, 2008.

VALENCIA-SANCHEZ, M. A. et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. p. 515–524, 2006.

VENTURINI, L. et al. Telomere maintenance mechanisms in malignant peripheral nerve sheath tumors: expression and prognostic relevance. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 6, p. 736–44, 2012.

VON ELM, E. et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **Lancet**, v. 370, n. 9596, p. 1453–1457, 2007.

WAHID, F. et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, 2010.

WAHID, F.; KHAN, T.; KIM, Y. Y. MicroRNA and diseases: Therapeutic potential as new generation of drugs. **Biochimie**, v. 104, p. 12–26, 2014.

WAJANT, H. The Role of TNF in Cancer. In: **Results and Problems in Cell Differentiation. Author Manuscript**. [s.l: s.n.]. v. 48p. 1–15.

WANG, H.-M.; ZHANG, X.-Y.; JIN, B. TERT genetic polymorphism rs2736100 was associated with lung cancer: a meta-analysis based on 14,492 subjects. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 17, n. 12, p. 937–41, 2013.

WANG, J. et al. Tumor-Associated circulating micrnas as biomarkers of cancer. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1912–1938, 2014.

WANG, J. I. N. et al. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. n. May, 2015.

WARD, B. A.; GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis 1: from lab bench to clinic. **Pediatr Neurol**, v. 32, n. 4, p. 221–228, 2005.

WEBER, J. A. et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–1741, 2010.

WENG, Y. et al. Identification of serum microRNAs in genome-wide serum microRNA

expression profiles as novel noninvasive biomarkers for malignant peripheral nerve sheath tumor diagnosis. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 30, n. 2, p. 531, 2013.

WITTKÉ-THOMPSON, J. K.; PLUZHNIKOV, A.; COX, N. J. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 6, p. 967–986, 2005.

WITWER, K. W. Mini-Reviews Circulating MicroRNA Biomarker Studies : Pitfalls and Potential Solutions Mini-Reviews. v. 63, 2015.

WU, X. et al. Telomere Dysfunction: A Potential Cancer Predisposition Factor. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 16, p. 1211–1218, 2003.

XU, L.; LI, S.; STOHR, B. A. The Role of Telomere Biology in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 49–78, 2012.

YANG, F. et al. The investigation for potential modifier genes in patients with neurofibromatosis type 1 based on next-generation sequencing. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 919–932, fev. 2018.

YANG, H. et al. Telomere Reverse Transcriptase (TERT) rs2735940 Increases Cancer Risk. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 612–616, 2015.

YAP, Y.-S. et al. The NF1 gene revisited - from bench to bedside. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 5873–92, 2014.

ZHANG, P. et al. EZH2-miR-30d-KPNB1 pathway regulates malignant peripheral nerve sheath tumour cell survival and tumourigenesis. **The Journal of pathology**, v. 232, n. 3, p. 308–18, 2014a.

ZHANG, Z. H. et al. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-seq data. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014b.

ZHU, X. et al. The association between telomere length and cancer risk in population studies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

ZINTZARAS, E. Variance estimation of allele-based odds ratio in the absence of Hardy-Weinberg equilibrium. **European Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 5, p. 323–326, 2008.

ZINTZARAS, E. Impact of Hardy-Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 25, n. 8, p. 553–560, 2010.

ZOU, P. et al. The TERT rs2736100 Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-analysis Based on 25 Case-Control Studies. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 7, 2012.

9. APÊNDICES

9.1. 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), coleta de amostra de sangue, análise de DNA e RNA a partir do sangue coletado, 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)3409-9753 com os Professores Marco-Aurélio Romano ou Débora Miranda ou ainda pode perguntar para o Grupo de profissionais que o (a) atendem no CNRF. 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, Belo Horizonte – MG. CEP: 31270-901. Tel: (31) 3499-4592/ coep@prpq.ufmg.br

9.3. Nuvem de palavras dos principais processos relacionados aos miRNAs em NF1



10. ANEXOS

10.1. Anexo 1: Protocolo de atendimento do CRNF



**Centro de Referência em
Neurofibromatoses**
Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Minas Gerais

<i>No do prontuário:</i>		<i>Data da primeira consulta:</i>	
<i>Nome:</i>			
<i>Endereço:</i>			
<i>Bairro:</i>	<i>CEP:</i>	<i>Cidade:</i>	<i>Estado:</i>
<i>Telefone:</i>		<i>Celular:</i>	
<i>e-mail:</i>			
<i>Sexo:</i>			
<i>Data nascimento:</i>		<i>Idade:</i>	
<i>Estado civil:</i>			
<i>Naturalidade:</i>		<i>Profissão:</i>	
<i>Filiação: Pai:</i>			
<i>Mãe:</i>			
<i>Encaminhamento? Não</i>		<i>Sim</i>	
<i>Como soube do CRNF?</i>		<i>Profissional/Especialidade:</i>	

Diagnóstico prévio de NF? Não Sim Idade do diagnóstico:
 NF1 NF2 Schwannomatose

Crítérios que ao primeiro olhar, história ou exames permitem o diagnóstico de NF:

QUEIXA PRINCIPAL e HMA

Parente de 1o grau com NF? Não sabe Sim Não Se sim, quem e que tipo?
 Não é NF () – Neste caso, completar o exame clínico, orientar e não incluir no arquivo NF.

Heredograma:

Co-morbidades**Cefaleia:****Convulsões:** () Não () Sim / Idade 1ª crise:

Data da última crise:

Neoplasia: () Não () Sim

Qual:

Idade do diagnóstico:

Hipertensão Arterial Sistêmica prévia:**Início da puberdade ou data da menarca:****Prurido:** () Não () Sim / Intensidade: () Leve () Moderado () Intenso**Piora com:** () Exposição ao sol () Sudorese () Outros:**Outras co-morbidades:****Tratamentos anteriores de alterações relacionadas à NF:****Medicamentos em uso:****Atividade física regular:** () Não () Sim / Qual e intensidade:**Crescimento e desenvolvimento:****Desempenho escolar:****Avaliação da sexualidade (libido, medo, vergonha, relacionamentos)****Exame físico:**

Peso:	<i>Kg</i>	Percentil:
Estatura:	<i>cm</i>	Percentil:
IMC:		Classificação:
Perímetro cefálico:	<i>cm</i>	Percentil:
PA: deitado:	<i>mmHg</i>	PA sentado: <i>mmHg</i>
FC:	<i>bpm</i>	FR: <i>irpm</i>
Tipo da Pele (Fitzpatrick):		<i>I II III IV V VI</i>

Manchas café com leite: () Não () Sim

Número aproximado:

Tamanho:

Idade do aparecimento:

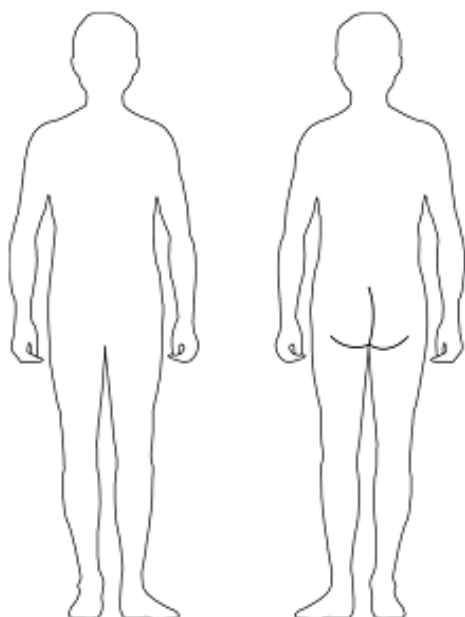
Falsas efélides: () Não () Sim Onde?**Neurofibromas:** () Não () Sim / Número:

Idade do aparecimento:

Neurofibroma plexiforme: () Não () Sim / Número:**Sintomático:** () Não () Sim Idade do aparecimento:**Hipertricose:** Não () Sim () - Local:**Fotografias:** Não () Sim ()

Se sim, tentar fotografar todas as lesões e assinar termo de consentimento.

Se não, descrever os locais das lesões:



M = manchas café com leite
 E = efélides
 O = neurofibromas
 X = plexiforme
 D = Displasia

Displasia óssea: Não Sim Não sabe

Esfenóide () Tibia ()

Escoliose: () Não () Sim Idiopática () Distrófica ()

Assimetria: () Não () Sim / Localização:

Hipotonia: () Não () Sim / Grupo muscular acometido:

Força muscular

Data	Força 1	Força 2	Força 3
Antebraço D Perímetro ()			
Antebraço E -Perímetro ()			

Oftalmologia:

Última consulta com oftalmologista:

Diminuição da acuidade visual? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Nódulos de Lisch? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Glioma óptico? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Proptose? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Catarata? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Estrabismo? Não Sim Idade do aparecimento

Não sabe

Ptose palpebral: Sim () Não () : Bilateral?

Aparelho cardiovascular:

Alteração da ausculta cardíaca: () Não () Sim

Se sim: () Sopro sistólico () Sopro diastólico / Outras:

Características:

Localização:

Aparelho respiratório:

Aparelho digestivo:

Alterações cognitivas perceptíveis ao primeiro exame? Não Sim Tipo:

Alterações da fala perceptíveis ao primeiro exame? Não Sim Tipo:

Classificação da gravidade (assinale um X na mais adequada, indicando os achados)

Minima	<i>MCL, nódulos de Lisch, Menos de 100 neurofibromas. Não aparenta a doença quando vestido</i>
Leve	<i>Mais de 100 neurofibromas, Distúrbios da puberdade, baixa estatura, macrocrania, problemas ortopédicos leves, Dificuldades de aprendizagem, distúrbios da voz e da fala, hipotonia muscular, Cefaleia crônica. Aparenta pouco a doença quando vestido</i>
Moderada	<i>Neurofibroma plexiforme, Convulsões controladas, Pseudoartrose, Hipertensão, Escoliose Aparenta a doença de relance.</i>
Grave	<i>Problemas de saúde causando incapacitação, Intervenções cirúrgicas frequentes, retardo mental, Tumores intracranianos e espinhais, hidrocefalia, feocromocitoma, Malignização, hipertrofias localizadas progressivas, Convulsões não controladas. Visibilidade imediata</i>

Plano de cuidados	Assinalar
<i>Entrega da cartilha "Entendendo a Neurofibromatose"</i>	
<i>Esclarecimento de dúvidas relativas à neurofibromatose.</i>	
<i>Aconselhamento genético</i>	
<i>Busca ativa de familiares possíveis portadores da neurofibromatose</i>	
<i>Controle dos níveis de pressão arterial</i>	
<i>Solicitação de avaliação pela Oftalmologia</i>	
<i>Solicitação de avaliação pela Psicologia</i>	
<i>Solicitação de avaliação pela Neurologia</i>	
<i>Encaminhamento para exérese de neurofibroma</i>	
<i>Solicitação de avaliação pela Fisioterapia</i>	
<i>Solicitação de avaliação pela Fonoaudiologia</i>	
<i>Outras especialidades:</i>	

Condutas

Retorno marcado para: / /

Profissionais que atenderam

--