



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ANÁLISIS DEL EXÓN 17 DEL GEN *NF1* EN PACIENTES CON
NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1 SIN NEUROFIBROMAS**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

DR. JOSÉ RAMÓN SOTO ÁLVAREZ

ASESORES DE TESIS: DR. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA



México DF

Julio 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ANÁLISIS DEL EXÓN 17 DEL GEN *NF1* EN PACIENTES CON
NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1 SIN NEUROFIBROMAS**

PRESENTA:

DR. JOSÉ RAMÓN SOTO ÁLVAREZ

TUTORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADOR:

M en C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Genética Médica, Hospital General de México



México DF

Julio 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
JEFE DEL SERVICIO DE GENÉTICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
ASESORA DE TESIS



México DF

Julio 2012

I.-AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios.

A mis papás y a mi hermana por darme todo el cariño y amor posible, por formarme como persona y apoyarme de manera incondicional en todas las etapas de mí vida.

Al Dr. Sergio Cuevas Covarrubias, Dra. María del Refugio Rivera, Dra. Gloria Queipo y al Dr. Juan Manuel Valdés por ser una parte muy importante en mí formación como médico especialista.

A todos mis compañeros residentes por apoyarme durante estos tres años.

A todo el personal trabajador del servicio de genética de los cuales he aprendido muchas cosas.

INDICE.

I.- AGRADECIMIENTOS	4
II.- SIGLAS Y ABREVIATURAS	7
III.- RESUMEN	8
IV.- ANTECEDENTES	10
1.- Incidencia y Prevalencia	11
2.-Cuadro clínico	12
3.-Correlacion genotipo fenotipo	31
4.- Gen y producto proteico	32
V.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	40
VI.- HIPOTESIS	41
VII.- OBJETIVOS GENERALES	41
VIII.- OBJETIVOS PARTICULARES	41
IX.- DISEÑO DEL ESTUDIO	42
X.-MATERIAL Y MÉTODOS	43
1.-POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO	43
2.- EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO	43
A) Obtención de muestra	43
B) Diseño de oligonucleótidos y PCR	44
C) Reacción de secuenciación	46
XI.- RESULTADOS	47

XII.- DISCUSIÓN	48
XIII.- GLOSARIO	51
XIV.-REFERENCIAS	54

II.- SIGLAS Y ABREVIATURAS

NF1 Neurofibromatosis tipo 1

NF2 Neurofibromatosis tipo 2

nf1 Gen de la Neurofibromatosis tipo1

CALMs Manchas Café con Leche

MPNST Tumores Malignos del Sistema Nervioso Periférico

UBOs Objeto Brillante no Identificado

AD Autosómico Dominante

SNC Sistema Nervioso Central

HAS Hipertensión Arterial Sistémica

GAPs Guanosintrifosfatasa

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pb Pares de bases

Wt Wild type

TAC Tomografía Axial Computada

IRMN Imagen por Resonancia Magnética Nuclear

III.- RESUMEN

La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) o enfermedad de Von Recklinghausen es una enfermedad autosómica dominante, multisistémica, con penetrancia completa que afecta aproximadamente una de cada 3500 personas, independiente de etnia y género, Se caracteriza por anomalías del tegumento y del sistema nervioso central. Clínicamente presenta dos o más de los siguientes datos: más de cinco manchas café con leche (CALMs), neurofibromas, efélides o signo de Crowe, nódulos de Lisch, glioma óptico, lesiones óseas distintivas y familiar afectado de primer grado. Manifestaciones menos comunes incluyen estatura baja, macrocefalia, problemas de aprendizaje, discapacidad, escoliosis, crisis convulsivas, hipertensión arterial sistémica, feocromocitomas y neurofibromas plexiformes.

El 30 a 50% de los casos se presenta por mutaciones nuevas en el gen *NF1*. Presenta una penetrancia de 100% y tiende a mostrar expresividad variable, indicando que existe una amplia gama de gravedad clínica y complicaciones en los pacientes.

Los síndromes relacionados con la NF1 son la neurofibromatosis segmentaria, la neurofibromatosis tipo 2 (NF2), solo CALMs, síndrome de Watson y el síndrome de Noonan.

El gen *NF1* se encuentra en el locus 17q11.2, el cual codifica para la neurofibromina proteína involucrada en vías de crecimiento y diferenciación celular. Se conocen más de 500 tipos diferentes de

mutaciones en el gen que causan la patología. Se han identificado más de 21 casos con diagnóstico de NF1 los cuales no presentan neurofibromas y se han asociado con una mutación en el exón 17 c.2970-2972 del AAT. Del mismo modo, se plantea la necesidad de generar un asesoramiento genético adecuado y ofrecer diagnóstico prenatal.

El objetivo del presente estudio es analizar clínica y genéticamente a un grupo de pacientes los cuales presentan múltiples manchas café con leche, y otros datos de NF1 pero sin la presencia de neurofibromas.

IV.- ANTECEDENTES.

Descripciones aisladas y dibujos de casos que probablemente representan pacientes con NF1 se han encontrado a través de los siglos de escritos médicos (1). Pero no fue hasta 1793 que Von Tilesius describe la patología por primera vez (2). Posteriormente en el año 1882, el profesor de patología de la Universidad de Estrasburgo, Fridreich Daniel Von Recklinghausen publicó un artículo de 149 páginas, en el que relacionaba los neurofibromas superficiales de la piel con los internos y proponía para la enfermedad el nombre de "facomatosis" del griego: *fakos* lunar, o marca de nacimiento (3). Catalogada dentro del grupo de los padecimientos neurocutáneos, durante muchos años esta condición se denominó "Enfermedad de von Recklinghausen" (4). En 1937 se describen los nódulos de Lisch. En 1982 (5), Riccardi realiza una clasificación de los tipos de neurofibromatosis en ocho categorías, las cuales no han sido bien aceptadas (6). La diferenciación entre neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2, no se realiza hasta 1987 cuando Barker, Seizinger y Rouleau, identifican los genes transmisores de cada enfermedad (7). En 1993 se describe la función de la neurofibromina como un tumor supresor.

Después de la clonación del gen *NF1* en 1990, se han realizado numerosos estudios que han tratado de analizar la correlación genotipo fenotipo (8), como ha sido el hallazgo de la mutación de delección de tres pares de bases AAT en el exón 17 del gen *NF1*, que se correlaciona con características pigmentarias de la NF1 sin la presencia de neurofibromas cutáneos ni plexiformes (9).

1.- INCIDENCIA Y PREVALENCIA.

La NF1 existe en todos los países sin presentar predilección de sexos, grupo étnico ni localización geográfica. Se transmite con patrón AD, es multisistémica, tiene una penetrancia de 100% con distinto grado de expresividad de la patología. Afecta a 1 de cada 3000 a 5000 personas a nivel mundial. La mitad de los casos se debe a mutaciones nuevas (10).

La neurofibromatosis tipo 1 es la más común con un 95% de los casos. Las variantes de la neurofibromatosis son:

- Neurofibromatosis mixta.
- Variantes de la neurofibromatosis.
- Neurofibromatosis segmentaria.
- Manchas café con leche sin neurofibromas.
- Neurofibromatosis tardía (11).

2.- CUADRO CLINICO

Los criterios diagnósticos para la NF1 fueron instituidos por consenso del Instituto Nacional de Salud en 1988. Se considera como caso positivo la presencia de de dos o más de los siguientes criterios:

1. La presencia de más de 5 CALMs mayor de 5mm de diámetro en individuos prepúberes, o más de 15 mm de diámetro individuos postpuberales.
2. La presencia de dos o más neurofibromas, o más de un neurofibroma plexiforme.
3. Efélides en región axilar o inguinal, signo de Crowe.
4. Glioma óptico.
5. Nódulos de Lisch.
6. Lesiones óseas como displasia del ala mayor del esfenoides o pseudoartrosis de tibia.
7. Familiar en primer grado afectado (12).

Manchas café con leche (CALMs).

Son manchas hiperpigmentadas típicamente ovoides. Es la manifestación clínica mas constante (95%) y usualmente son la primera manifestación en aparecer, generalmente no están presentes al nacimiento, pero aparecen durante el primer año de vida (Figura 1) (13,14).

Los melanocitos de las manchas café con leche, se encuentran en número pero con mayor cantidad de macromelanosomas (15) (Figura 2).

Figura 1 Paciente con CALMs.



Cabe mencionar que 25% de la población en general pueden tener CALMs sin otros síntomas de NF1 (10).

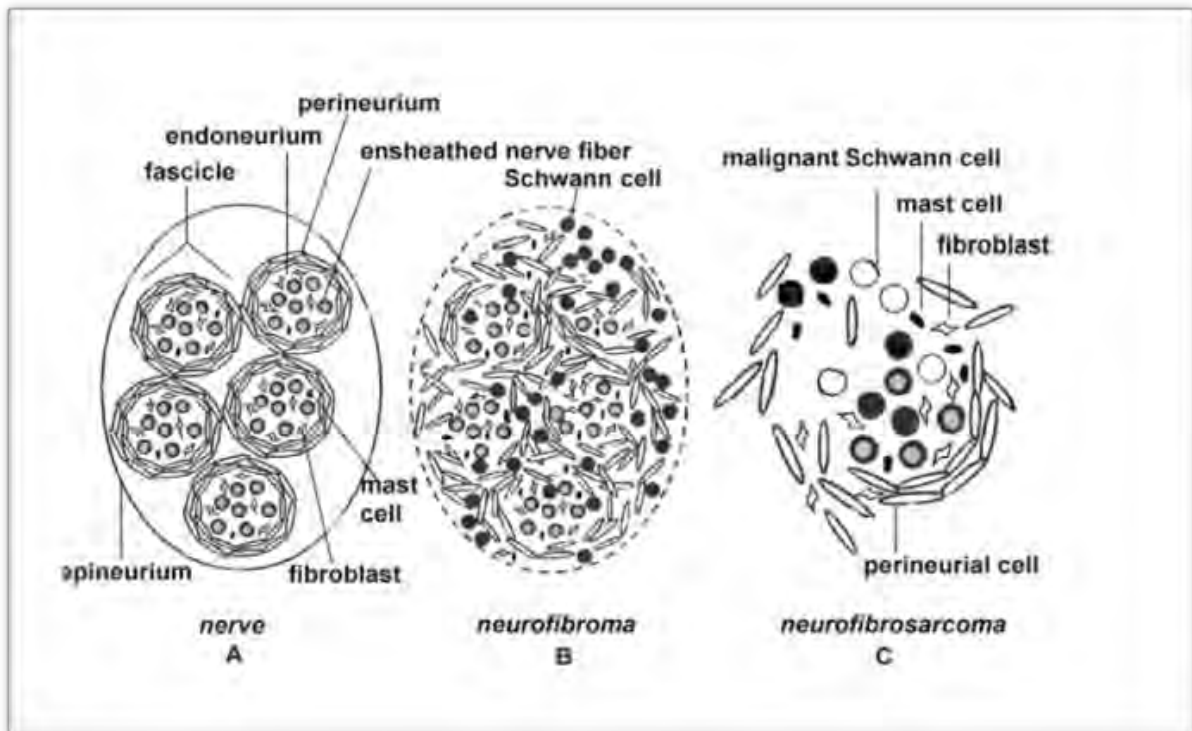
Figura 2 Macromelanosomas en una mancha café con leche.



Neurofibromas.

Los neurofibromas son tumoraciones formadas por una mezcla de células de Schwann, fibroblastos, células perineurales (generalmente de distribución focal), células del endotelio vascular, células cebadas, melanocitos y pueden contener fragmentos de axones (16) (Figura 3). Son circunscritos pero no están encapsulados.

Figura 3 Conformación de los neurofibromas.



Clínicamente se pueden presentar de forma cutánea o subcutánea. Los neurofibromas cutáneos están situados en la epidermis y forman una pápula aislada de consistencia blanda a firme adherida a la piel, pueden medir desde milímetros hasta centímetros. Pueden estar en formas aplanadas, sésiles, pedunculadas, cónicas o lobuladas (Figura 4).

Los neurofibromas subcutáneos se encuentran en tejido adiposo, son nódulos firmes, discretos, únicos o múltiples. Están dispuestos a lo largo del trayecto de un nervio como cuencas de rosario, por lo que en ocasiones generan dolor o sensibilidad a la palpación local (17).

La edad de aparición de los neurofibromas es al final de la primera década de la vida o en la adolescencia, su número y tamaño aumentan con los años, rara vez se presentan al nacimiento. El 48% aparece en los primeros 10 años de vida, 84% de los pacientes ya los presentan a los 20 años de edad y virtualmente todos los pacientes a la edad de 40 años de edad han presentado al menos una de estas tumoraciones. Cuando aparecen quedan estables por un par de años hasta el comienzo de la pubertad o el embarazo. Son tumores dependientes de hormonas ya que 75% de éstos muestran receptores para progesterona y 5% para estrógenos. Tienen predilección por tronco y cara (Figura 4).

El 16.8% de los pacientes desarrollan neurofibromas plexiformes, se pueden manifestar de dos formas: como nódulos firmes y discretos unidos a plexos o a raíz nerviosa o como un tumor voluminoso del tejido subcutáneo que compromete piel, fascia, músculo, puede infiltrar vísceras e incluso erosionar estructuras óseas (displasia del ala mayor del esfenoides). Los neurofibromas plexiformes se originan de tronco nerviosos mayores, son de forma irregular, difusos y vascularizados. El 43% se localizan en tronco, 42% en cuello y 15% en extremidades.

Los neurofibromas pueden sufrir transformación maligna en 5 a 13% en el sistema nervioso periférico (MPNSTs), (neurosarcomas agresivos). Se sospecha de transformación maligna cuando se presenta crecimiento rápido de la tumoración y acompañada de dolor. La aparición de estas tumoraciones se debe a la pérdida de la heterocigosidad, hipótesis de Knudson (18).

Figura 4 Paciente con múltiples neurofibromas.



Efélides (signo de Crowe).

Generalmente se presentan en región axilar o inguinal, pero también pueden estar en regiones intertriginosas, en cuello y surcos inframamarios (Figura 5). Se presentan en 90% de los pacientes. Su característica es que aparecen en áreas que no están expuestas al sol (17). Aparecen en la infancia tan solo poco tiempo después de la aparición de las manchas café con leche (10).

Figura 5 Paciente con signo de Crowe en región axilar.



Glioma óptico.

Es el tumor del sistema nervioso central más frecuente en estos pacientes, se presenta en 15% de los afectados. La edad de aparición es en la primera década de la vida, generalmente antes de los 6 años de edad. Están formados por células gliales y material mucinoso, son típicamente intradurales y pueden ser múltiples. (Figura 6)

Figura 6 Glioma óptico en paciente con NF1.



Un tercio de los pacientes que tiene la tumoración presentan síntomas. Datos comunes son disminución de la visión y proptosis (Figura 7). Con menos frecuencia se presenta estrabismo, nistagmus; síntomas por invasión al hipotálamo ocasionando pubertad precoz e hidrocefalia. Usualmente hay un deterioro inicial de la visión que luego se estabiliza. En fondo de ojo hay combinaciones de edema y atrofia del disco óptico, los defectos campimétricos son variables (17).

Pueden sufrir regresión por lo que su tratamiento por medio de cirugía es controversial y la mayoría de las ocasiones se reserva cuando hay sintomatología significativa. La quimioterapia puede utilizarse en pacientes sintomáticos menores de 5 años de edad, la radiación se utiliza en niños mayores a quienes les fue realizada una resección parcial o después de quimioterapia (18,19).

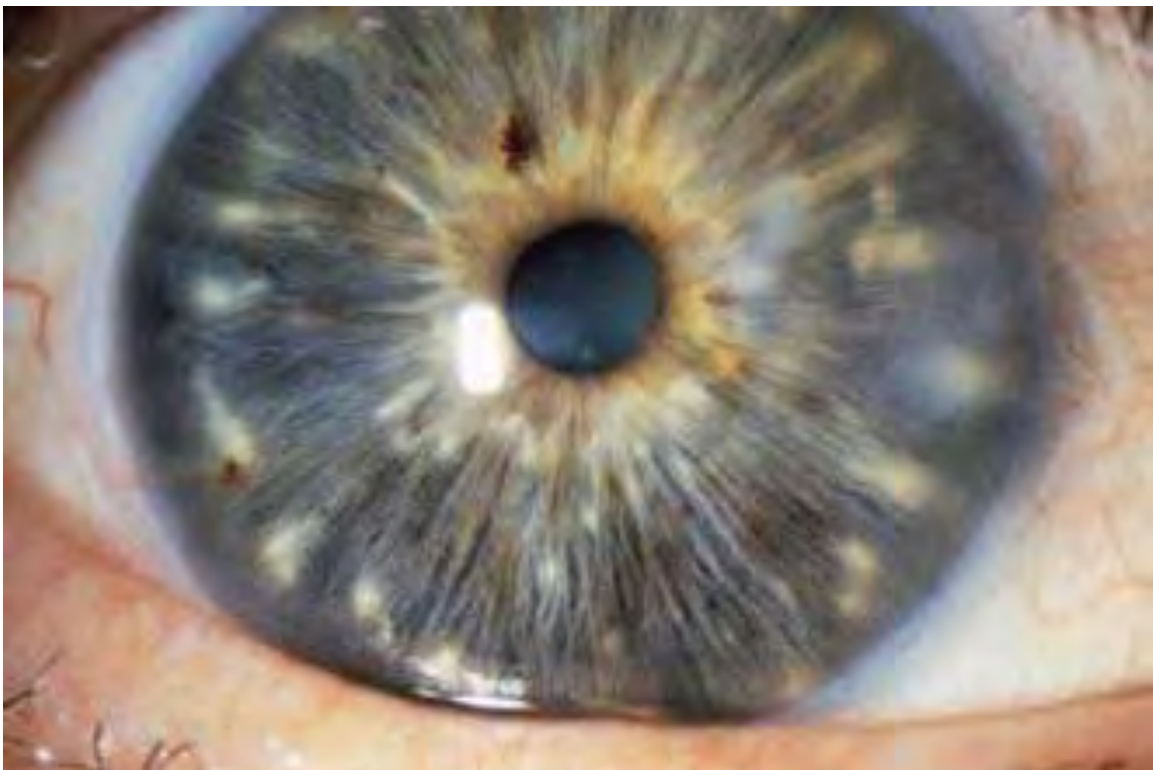
Figura 7 Proptosis en paciente con glioma óptico.



Nódulos de Lisch.

También conocidos como nevos del iris. Son nódulos pigmentados del iris que patológicamente representan hamartomas (Figura 8). Son crecimientos benignos que no afectan la visión. Su significado solo es diagnóstico ya que aparecen en 80 a 100% de los afectados. Su edad de aparición es después de los 2 años de edad y antes de las primeras décadas de la vida (10).

Figura 8 Nódulos de Lisch.



Lesiones óseas.

La pseudoartrosis de la tibia ocurre en 2 a 5% de los afectados, generalmente ocurre antes de los dos años de edad, pero puede estar presente al nacimiento (Figura 9). La afectación se puede ocasionar por la presencia de un neurofibroma en la corteza del hueso largo, lo que predispone a fracturas y mala unión de los fragmentos. La displasia del esfenooides no es un dato común, puede deberse a un neurofibroma plexiforme con infiltración ósea (Figura 10). La neurofibromina como regulador del RAS es importante en la homeostasis de las células osteoprogenitoras y también está presente en el cartílago del crecimiento, en las zonas donde cesa la proliferación y comienza la diferenciación de los condrocitos, así como en los osteoblastos del periostio (10, 20).

Figura 9 Pseudoartrosis de tibia en paciente con NF1.

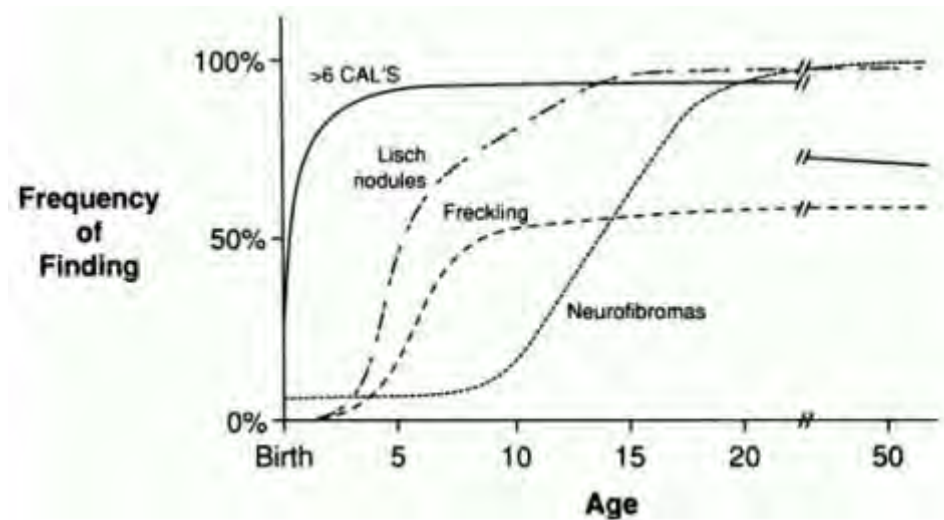


Figura 10 Displasia del ala mayor del esfenoides



Edad de presentación.

La edad de presentación de los datos clínicos es variable. La siguiente grafica ejemplifica la edad promedio de presentación de algunas características (10).



Otras manifestaciones clínicas.

UBOs. (Objeto brillante no identificado). Son imágenes brillantes o hiperintensas que aparecen en T2 en IRM. Estas lesiones aparecen más comúnmente en cerebelo, ganglios basales y sustancia blanca, no causan efecto de masa y pueden representar un aumento de la mielina o áreas de proliferación glial displásica. Los UBOs no causan efecto de masa y no representan lesiones malignas pero si se asocian a déficit cognitivo. En biopsia se llegan a observar cambios vacuolares o espongióticos.

Disfunción cognitiva. Estos pacientes pueden tener un IQ promedio de 70 puntos. La dificultad para el aprendizaje se presenta en 30 a 65% de los pacientes. Podemos encontrar alteraciones del lenguaje con afectación de la integración visual motora. Se observa retraso mental en 4 a 8% de los casos cuando hay una deleción del intrón 27b por alteración del gen OMG.

Convulsiones. Alrededor de 4% presentan convulsiones, pueden ser focales o generalizadas, causadas por tumores del SNC (como los astrocitomas), o por proliferación glial displásica. Los pacientes con NF1 tienen 20 veces más riesgo de presentar crisis convulsivas que la población en general.

Neuropatía. Es sensitiva motora y se asocia a la presencia de neurofibromas en el trayecto de un nervio.

Macrocefalia. Es ocasionada la mayoría de las veces por aumento de la sustancia blanca cerebral o por hidrocefalia debido a estenosis del acueducto.

Talla baja. Se presenta en 13 a 24% de los casos en prepuberales y en 40% en adultos.

Escoliosis. Ocurre en un 5 a 10% como resultado de la deformación de los cuerpos vertebrales por los neurofibromas que infiltran el foramen vertebral. Las xifosis cervical y torácica son las más comunes.

Vasculopatía. Generalmente se debe a la hipertrofia de la íntima de los pequeños vasos. Resultando en estenosis, oclusión, formación de aneurismas o fistulas arteriovenosas. Las anomalías cerebrovasculares se deben a estenosis u oclusión de las arterias carótidas internas, cerebral anterior y media.

Hipertensión arterial sistémica (HAS). Aproximadamente, 70% de los pacientes desarrollarán HAS, en su mayoría será esencial. Sin embargo en los niños generalmente es ocasionada por estenosis de la arteria renal y en 1% de los casos por un feocromocitoma o paraganglioma productor de adrenalina.

Cardiopatía congénita. Se presenta en 2 a 3% de los pacientes. En su mayoría son defectos del tabique atrial o ventricular, bloqueo cardíaco congénito, estenosis de la pulmonar o coartación de la aorta. Esto debido a la existencia de isoformas específicas de la neurofibromina en el músculo, la cual también es sobre-expresada en

músculo cardíaco y esquelético durante el desarrollo embrionario, lo cual indica que la neurofibromina es crítica para la diferenciación normal del músculo.

Leucemia mieloide crónica. Alrededor de 10% de los pacientes con este tipo de leucemia también padecen NF1. Esto debido a que p21RAS activa a un factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos, ocasionando hiperproliferación clonal crónica y transformación maligna.

Constipación. Ocurre cuando los neurofibromas infiltran vísceras.

También se presentan glaucoma congénito e hiperactividad en estos pacientes (7,10).

Diagnóstico.

El diagnóstico es clínico, en pocas ocasiones se puede realizar estudios moleculares, se debe de tomar en cuenta que la tasa de mutación en este padecimiento es muy alta, siendo los exones 10 y 37 los más frecuentemente implicados.

Las pruebas moleculares no están indicadas de manera rutinaria en el diagnóstico de la NF, pero puede ser útil en individuos sospechosos, en diagnóstico prenatal o preimplantación, o cuando el diagnóstico genético se desea. La limitación del test genético es también ocasionada por la escasez de correlación genotipo-fenotipo.

Se han detectado más de 500 tipos de mutaciones, siendo las deleciones las más comunes. El punto en común de la mayoría de las mutaciones es que originan proteínas truncas. Se puede utilizar el test de proteínas truncas, análisis de secuenciación, MLPA (amplificación múltiple con sonda dependiente de ligando), y análisis citogenético en caso de re arreglos la cual diagnostica el 1% de los casos (7,10).

Los diagnósticos diferenciales de NF1 son:

- Neurofibromatosis tipo 2.
- Schwannomatosis.
- Manchas café con leche.
- Síndrome de LEOPARD.
- Síndrome de McCune Albright.
- Síndrome de Noonan.
- Lipomatosis múltiple.
- Síndrome de Bannayan Riley Ruvalcaba.
- Fibromatosis hialina juvenil.
- Fibromatosis congénita generalizada
- Nevo intradérmico múltiple.
- Síndrome de Klippel Trenaunay Weber.
- Síndrome de Proteus.(10)

Tratamiento.

Deben de participar múltiples especialistas como: genetistas, neurólogos, neurocirujanos, ortopedistas, oftalmólogos, nefrólogos, psicólogos, dermatólogos, radiólogos, cirugía plástica, oncología. Examen físico anual, checar tensión arterial en cada visita, buscar signos de pubertad precoz, checar problemas de aprendizaje, evaluación neuro psiquiátrica, examen oftalmológico anual (7,10).

Una vez que el diagnóstico se considera, los pacientes deben ser referidos a los médicos expertos en el diagnóstico de la NF1. En la evaluación del paciente adulto se toman en cuenta las siguientes consideraciones en cuanto a su tratamiento:

1.-Las manchas no suelen degenerar y su único problema es el estético.

2.-El prurito

3.-El dolor suele responder a analgésicos, aunque en otros pacientes puede ser preciso asociar antidepresivos, neuroestimulación subcutánea o incluso la cordotomía.

4.-Los neurofibromas son benignos aunque pueden originar compromiso funcional: compresiones o dolor, en cuyo caso hay que valorar su extirpación. Los neurofibromas cutáneos o subcutáneos que son desfigurantes pueden ser removidos quirúrgicamente, los plexiformes en ocasiones no pueden ser removidos por su extensión o por las estructuras involucradas. El dolor de crecimiento rápido de una

de las tumoraciones puede ser indicativo de malignidad y requiere evaluación inmediata, con biopsia para su examen histológico, se puede otorgar quimio y radioterapia

5.- Los gliomas del nervio óptico no se tratan mientras no crezcan o tengan manifestaciones clínicas. En este caso se usa la quimioterapia preferentemente.

6.- Los tumores intracraneales requieren su evaluación tanto clínicamente como con estudio de imagen (RNM) para intervenir, si fuera preciso.

7.- La pseudoartrosis de tibia puede tener difícil consolidación, proponiéndose para ello el trasplante de peroné vascularizado o la amputación proximal. Las escoliosis distrofica requiere tratamiento quirúrgico, el cual es complejo

8.- El hipocrecimiento puede responder favorablemente a la hormona de crecimiento.

9.- La pubertad precoz se debe frenar con análogos de la GnRH.

10.- La hipertensión de causa renal se trata con cirugía vascular o nefrectomía, y el feocromocitoma con cirugía y quimioterapia (34).

Una consideración especial es la evaluación clínica de los niños con NF1 deben incluir a parte de lo mencionado anteriormente los siguientes aspectos: el desarrollo general (motor / la función cognitiva), los síntomas visuales, de desarrollo de la pubertad (con

efectos retardados / pubertad precoz), la presión arterial (estenosis de la arteria renal), examen cardiovascular (cardiopatía congénita, estenosis pulmonar) (7).

Actualmente se están ensayando múltiples fármacos como: El ácido 13 cis-retinoico, interferón alfa-2, y etopósido, para frenar el crecimiento de los neurofibromas plexiformes y de los gliomas ópticos. Pirfenidona sobre el crecimiento de estos tumores. Tipifarnib inhibe la proteína de transferencia farnesyl Interfiere en adecuado funcionamiento de RAS. Rapamycin inhibe a FKBP12 un supresor de la vía mTOR. Lovastatin es una HMGC_oA inhibe a farnesyl. Y la vitamina D (19, 35).

La esperanza de vida es de 10 a 15 años menos que para el resto de la población, generalmente debido a tumores malignos como los neurosarcomas (10).

Una parte muy importante en estos pacientes es el consejo genético. Un paciente con diagnóstico de NF1 el riesgo de recurrencia para su descendencia es de 50% por embarazo No se conocen hijos recién nacidos vivos de dos progenitores con NF1. Probablemente la naturaleza los aborte por la gravedad de las alteraciones, incompatibles con la supervivencia prenatal. Si se trata de una mutación de novo (padre y madre indemnes), la probabilidad de un segundo hijo afectado es del 1-2% (dada la posibilidad de un mosaico

gonadal en uno de los progenitores). El diagnóstico prenatal es posible si la mutación del progenitor está identificada. (10)

3.- CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

Hasta la fecha sólo dos correlaciones de importancia clínica se han reportado en NF1 (21).

1.-El síndrome de microdeleción de NF1, los cuales desarrollan un gran número de neurofibromas para su edad, rasgos dismórficos, un probable aumento de MPNST, anomalías cardíacas y sobrecrecimiento, problemas del aprendizaje y retraso mental es más frecuente en este grupo de pacientes (22).

2.- Fenotipo solo manchas café con leche (7,23).

Fenotipo de sólo manchas café con leche.

Este término se utiliza para describir familias multigeneracionales con solo la presencia de manchas café con leche y en ocasiones acompañadas de efélides axilares. Dos estudios recientes han dilucidado la base genética de este fenotipo.

A) Una deleción de tres pares de bases en el exón 17 del gen *NF1* c.2970–2972 del AAT. Estos pacientes solo tienen múltiples manchas café con leche y efélides, sin la presencia de neurofibromas. También presentan menores complicaciones como menor frecuencia de problemas del aprendizaje, macrocefalia, estatura corta, escoliosis así como un incremento en la frecuencia de estenosis de la pulmonar. El dato característico de este fenotipo es la ausencia de neurofibromas dérmicos en los pacientes adultos (7).

B) Mutaciones en el gen *SPRED1*. Recientemente, se informaron mutaciones en el gen *SPRED1* en el cromosoma 15, en cinco familias que presentaban manchas café con leche, efélides axilares y macrocefalia sin la presencia de neurofibromas ni de nódulos de Lisch. Otras características clínicas que se superponen con las de *NF1* en estos pacientes son problemas de aprendizaje, problemas de déficit de atención en algunos pacientes y el pectus excavatum. *SPRED1* regula negativamente la señalización de MAPK como la neurofibromina. Las mutaciones se encontraron en las cinco familias (23).

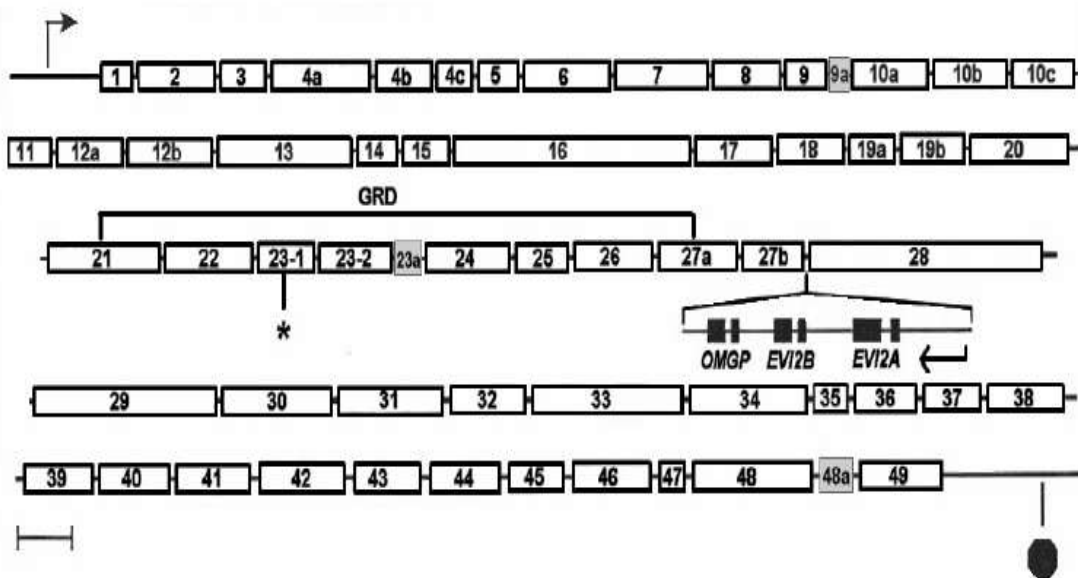
4.- GEN Y PRODUCTO PROTEICO.

El gen *NF1* está en el locus 17q11.2. Tiene un marco de lectura de 8454 nucleótidos, se expande 350,000 nucleótidos de DNA y presenta 60 exones. Se localiza en la región pericentromérica en

dirección centrómero a telómero. Presenta una de las más altas tasas de mutaciones espontáneas en el genoma humano. El transcrito de mRNA es de 12-15 Kb.

Existen varios genes dentro del gen *NF1* los cuales se leen en sentido inverso al de *NF1*. Uno se encuentra en el intrón 27 el cual es la glicoproteína mielina de oligodendrocitos (*OMG*), tiene participación en desarrollo de conexiones en el sistema nervioso central. *EV12A* y *EV12B* genes asociados a la leucemia mieloide murina (24) (Figura 11).

Figura 11 Localización *OMG*, *EV12A* y *EV12B* en el gen *nf1*.



El gen *NF1* sufre de empalme alternativo en los exones 9a, 10a-2, 23a y 48a. En cada caso la inclusión de cada uno de estos exones no perturba el marco de lectura en general. Un número diferentes de transcritos se han encontrado que se expresan diferencialmente en

diversos tejidos en los individuos normales. De hecho se ha sugerido que las diferencias cuantitativas que existen entre estos transcritos diferentes en los pacientes, pueden contribuir a la variabilidad fenotípica que se presenta en la NF1 (25).

El promotor de *NF1* se encuentra dentro de una isla CpG que contiene una región genómica que exhibe un alto grado de conservación de la secuencia con genes de *NF1* que se encuentran en otros organismos. Hasta la fecha no se han encontrado mutaciones patogénicas dentro del promotor (26).

La región no traducida (UTR) es de 3.5 kb de longitud y también exhibe un alto nivel de conservación de la secuencia, lo que indica su posible importancia funcional ya sea para la regulación de la estabilidad del mRNA, o para controlar eficacia de la traducción del gen (27).

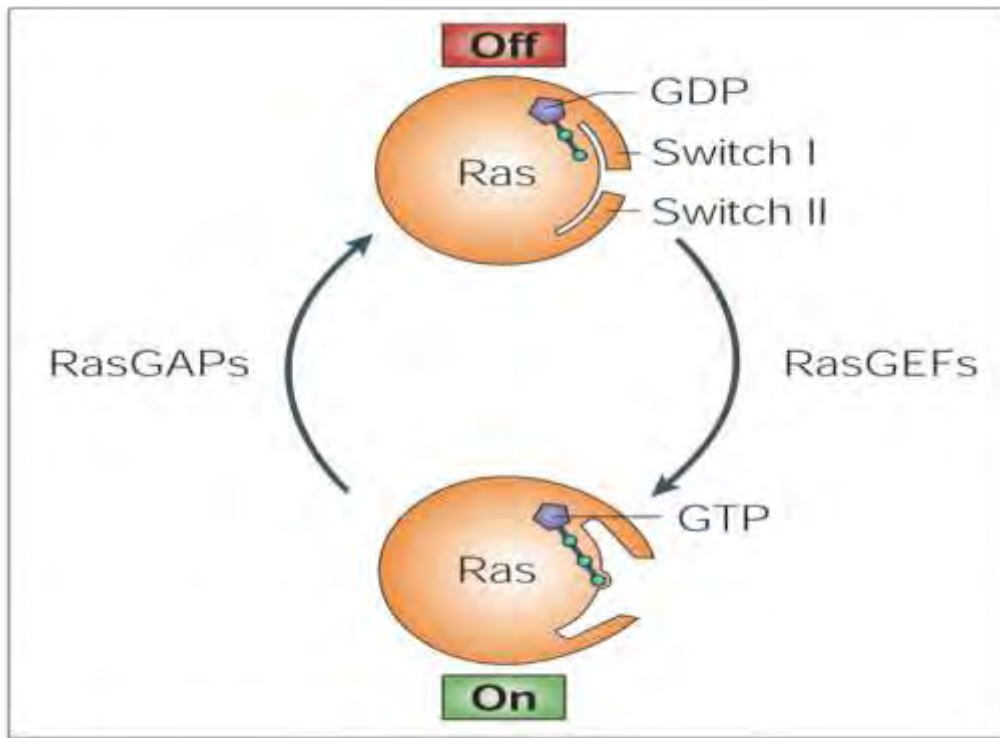
Neurofibromina y su interacción con la familia de RAS

El producto proteico del gen *NF1* es la neurofibromina, una proteína pleiotrópica, con función tumor supresor la cual está formada por 2,818 aminoácidos y se expresa, en cerebro, bazo, riñón, testículo y timo entre otros órganos. La proteína tiene un dominio central (exón 20-27) que la hace en estructura muy similar tanto estructural como funcionalmente a la familia activadora de proteínas de

guanosintrifosfatasa (GAPs), llamado dominio GRD el cual regula negativamente la actividad de RAS (10,).

Cabe señalar que la neurofibromina participa en diversas vías de señalización, como en la vía de Ras. El oncogen Ras es miembro de una gran familia de proteínas de aproximadamente 21 kDa, son GTPasas monoméricas asociadas a membranas, las cuales se presentan en dos formas, unida a GTP es su forma activa y unida a GDP es su forma inactiva. La neurofibromina activa a RAS GTP acelerando la hidrólisis de su forma activa p21 RAS GTP a su forma inactiva p21 RAS GDP (Figura 12).

Figura 12 Inactivación de RAS GTP a RAS GDP.



La familia de Ras es una subfamilia que pertenece a la superfamilia de proteínas G y está formada por HRas, KRas, NRas, R-Ras, TC21, MRas, Rap 1A, Rap 1B, Rap 2A, Rap 2B, Ra1A y Ra1B.

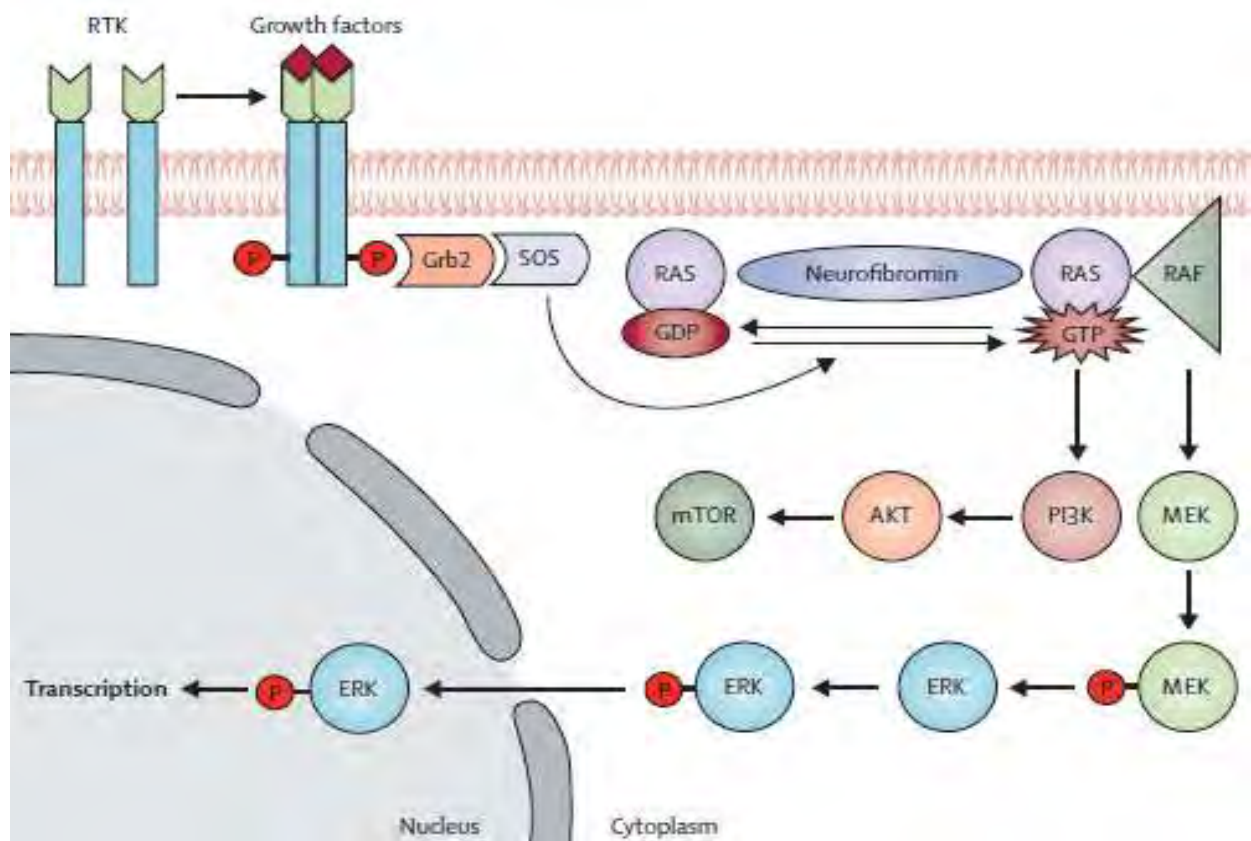
Ras GTPasa es un mediador esencial en vías de señalización que llevan el estímulo extracelular de los receptores de superficie celular. Las proteínas RAS actúan como interruptores moleculares en el proceso de proliferación, diferenciación, sobrevivencia y muerte. Estas pueden ser activadas mediante receptores tirosina cinasas, acoplada a receptores de proteínas G heterotrimérica, receptores de citosinas, canales de calcio e integrinas (28).

El dominio GRD, mediante el cual interacciona la neurofibromina y Ras, funciona como regulador celular, que traduce señales de la membrana plasmática hacia el núcleo mediante efectores río abajo, a través de su dominio estimula la hidrólisis de GTP a GDP que es su forma inactiva, suprimiendo la función de proliferación celular.

Ras en su forma natural se encuentra inactivo, para que Ras sea activado debe existir un factor de crecimiento el cual hace contacto con los receptores de superficie membranal tirosina cinasa. Éstos activan factores intercambiadores (GEF) que se unen a proteínas adaptadoras como Grb2, Shc, Shc2 y Gab, las cuales activan a SOS1 que es una cinasa que fosforila a GDP-Ras (Inactivo) y es trifosfatada en su forma GTP-Ras (activo), enviando señales a las cinasas BRAF, ARAF Y RAF1, que van a fosforilar a MEK y este a su vez a ERK. Este último actúa directamente sobre los factores de transcripción JUN/MYC que inician el proceso de proliferación celular. Otra vía de

señalización que se activa mediante GTP-Ras es a través de la vía de PI3 que envía señal a AKT y da como resultado la inhibición de la apoptosis (29). (Figura 13). Por lo tanto una disminución de la proteína de la neurofibromina puede causar crecimiento celular descontrolado y formación de tumores (10).

Figura 13 Vía de crecimiento de RAS.



Mutación de delección c.2970-2972 AAT en el exón 17 de *NF1*

Se prevé que la pérdida de c.2970-2972 AAT en el exón 17 elimina una metionina (codón 991, DMet991), este residuo de metionina se encuentra en una región altamente conservada de neurofibromina que probablemente tiene un importante papel funcional. La estructura de la proteína junto con sus interacciones, contribuye a la variación observada en el fenotipo clínico de este trastorno en particular. Por lo tanto, las consecuencias de esta delección en la proteína mutante podría revelar información sobre el papel potencial funcional de esta región de neurofibromina (30).

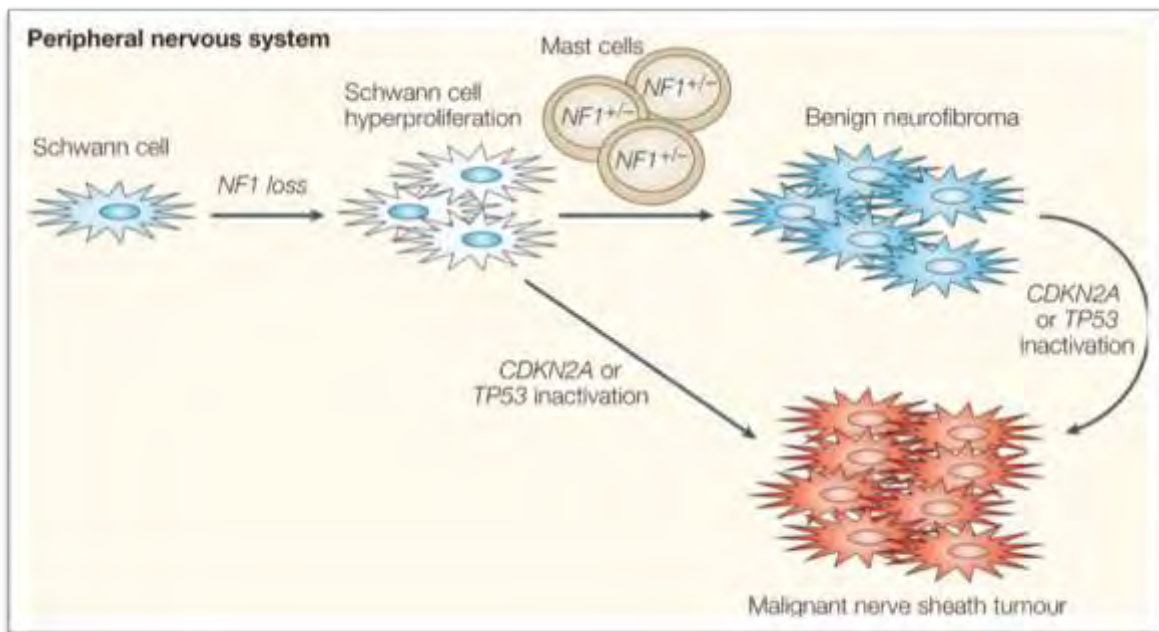
El resultado de la pérdida de metionina en el alelo mutado, lleva a una reducción parcial en el nivel global de neurofibromina en las células, pero no interfiere en el desarrollo de la proteína.

La evaluación del efecto de esta mutación a nivel de la proteína es necesaria, dado que esta mutación se encuentra al final del dominio CSRD de la neurofibromina, es posible que la pérdida de metionina dentro de esta región induzca la fosforilación aberrante del residuo de treonina situada inmediatamente adyacente a la metionina eliminada (31).

Los neurofibromas son heterogéneos a nivel celular, están compuestos principalmente de las células de Schwann, fibroblastos, mastocitos y células perineurales. Si bien sólo las células de Schwann sufren una segunda mutación a nivel somático. En un sistema de modelo murino *Nf1* se demostró que es la interacción de los

mastocitos haploinsuficientes con las células de Schwann completamente deficientes de neurofibromina lo que induce el desarrollo de los neurofibromas (32) (Figura 14). Por tanto es posible que, en pacientes con la supresión de AAT, esta interacción celular entre las células cebadas y células de Schwann se interrumpa dando lugar al fracaso de la formación de neurofibromas (33).

Figura 14 Interacción de células de Schwann y mastocitos en la formación de neurofibroma.



Un estudio reciente proporciona evidencia molecular que implica el papel de una supresión específica de 3-pb del *NF1* en la determinación de un fenotipo clínico particular, es decir la ausencia casi total de desarrollo de neurofibromas cutáneos, subcutáneos, y plexiformes superficiales. Este hallazgo es de importancia clínica, ya

que se ha demostrado que los neurofibromas plexiformes se asocian a un aumento del riesgo de MPNST. No se conoce si esta mutación se asocia con la ausencia de neurofibromas internos, ya que ningún estudio imagen de cuerpo o columna vertebral se llevó a cabo en estos pacientes.

La ausencia de cualquier forma de neurofibroma se ha observado en las familias con solo manchas café con leche y también en algunos casos con las síndrome de Watson, que a menudo tienen pocos o ningún neurofibroma cutáneo.

V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la NF1 es una de las patologías AD más comunes. En la población mexicana no existen datos de incidencia sobre ésta enfermedad; en el servicio de Genética médica y Dermatología del Hospital general de México, hemos observado que existe una gran asistencia de estos pacientes, lo que ha despertado nuestro interés para estudiar molecularmente esta patología. Contamos con un grupo de pacientes con NF1 los cuales no presentan neurofibromas. Por lo que nuestro planteamiento del problema se definiría así: existe en una muestra de nuestra población la correlación genotipo/fenotipo entre el defecto molecular de la pérdida de los tres pares de bases c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1*, y la ausencia de neurofibromas en la NF1.

VI.- HIPÓTESIS.

La pérdida de los tres pares de bases c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1*, resulta en la ausencia de neurofibromas en la *NF1*. La nuestro grupo de pacientes con *NF1* sin neurofibromas presentan la microdelección de tres pares de bases en el exón 17.

VII.- OBJETIVOS GENERALES

Identificar si existe una correlación genotipo/genotipo entre la presencia del defecto molecular de la pérdida de los tres pares de bases c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1*, y la ausencia de neurofibromas en la *NF1*.

VIII.- OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar la frecuencia de la pérdida de los tres pares de bases c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1* en pacientes sin neurofibromas.

Conocer la frecuencia del defecto molecular mencionado anteriormente en la muestra de pacientes mexicanos analizada.

Identificar si existen otros defectos moleculares en la región anteriormente mencionad en la muestra analizada.

IX. DISEÑO DEL ESTUDIO

1.- Tipo de estudio.

Prospectivo, transversal, comparativo, observacional.

2.- Muestra

Revisamos clínicamente 250 pacientes con NF1 del servicio de Genética médica del Hospital general de México, de los cuales obtuvimos 6 pacientes con las características clínicas necesarias.

2.1.- Criterios de inclusión:

Pacientes con NF1 sin neurofibromas mayores de 16 años.

2.2.- Criterios de exclusión:

Pacientes con la presencia de neurofibromas.

Pacientes que no deseen participar en el estudio

3.- Variables del estudio

Independiente: Pacientes con NF1 sin neurofibromas

Dependiente: Presencia de la pérdida de los tres pares de bases c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1* en pacientes sin neurofibromas.

X.-MATERIAL Y MÉTODOS

1.-POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

A).- Pacientes con NF1.

Los pacientes recibieron asesoramiento genético previo y posterior a la toma de muestra sanguínea. La muestra se tomó con consentimiento informado. Además se interrogó a cada uno de ellos y se realizó estudio molecular.

2.- EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

El material ADN se extrajo a partir de una muestra de sangre periférica, utilizando el método salino, que consiste en el empleo de NaCl a diferentes concentraciones adicionando agentes tensoactivos con la finalidad de obtener ruptura y extracción de micelas/proteínas de las membranas celular y nuclear obteniendo el material nucléico con una calidad de 1.8 en relación a la absorbancia 260nm/ 280 nm.

A).-Obtención de muestra

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica anti coagulada con EDTA, de los cuales se aislaron los glóbulos blancos, que fueron lavados con solución de TTS (Tris-Tritón-Sacarosa) en una proporción 1:1. La ruptura de membrana inicio colocando 540 μ l de NaCl al paquete globular, con agitación por dos min. Enseguida se agrego 30

μl de SDS agitando durante 5 min y por último se le adicionaron 200 μl de NaCl saturado, agitando durante 10 min. La mezcla se centrifugo por 20 min a 11, 000 rpm a 4°C. El sobrenadante se decanto en un tubo estéril y se procedió a precipitar el ADN con 2 ml de etanol frio.

La muestra de ADN se capturo con una varilla estéril y se lavo con Et-OH al 70%. Se elimino el exceso de etanol y la muestra se suspendió en 250 ml de agua inyectable durante 2 horas a 60 °C.

B).-Diseño de oligonucleótidos y PCR

El diseño de los oligonucleótidos se llevo a cabo con base a la secuencia del exón 17 del gen *NF1* en la liga <http://genatlas.med>, que corresponde c.2970-2972 del AAT, como se muestra a continuación

EXÓN 17

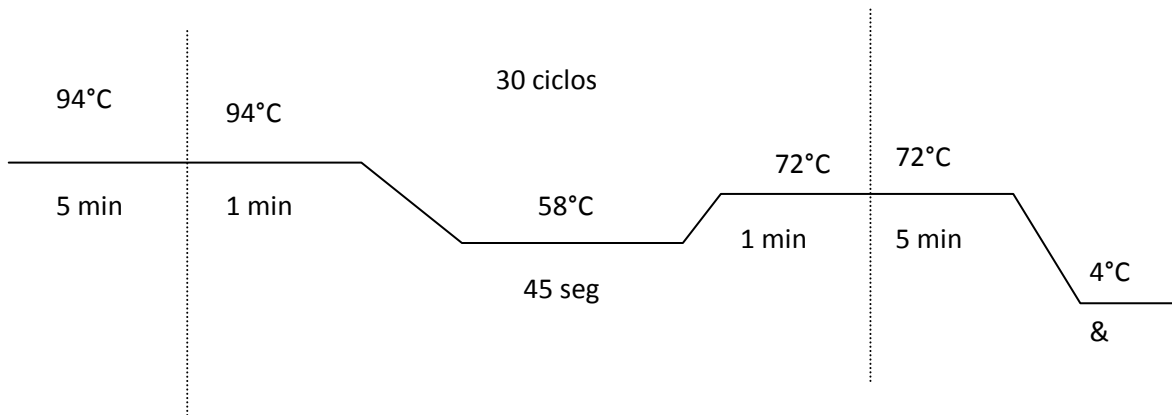
```
gtttcacatctctctagggggtctgtcttctgggcattgatggcaaatcattaatg  
tatttgttcttttctttagGTTTTATTGACTGATACCAATACTCAATTTGTAGAA  
CAAACCATAGCTATAATGAAGAACTTGCTAGATAATCATACTGAAGGCAGCTCT  
GAACATCTAGGGCAAGCTAGCATTGAAACAATGATGTTAAATCTGGTCAGgtaa  
gcattctactgaaatgtagcagaaacattttaaagagataagaaaaacctcttac  
aactgatactggt
```

NF1 F: TAG GTT TTA TTG ACT GAT CCA AT
NF1 R: TCA GTA GAA TGC TTA CCT GAC CA

Las condiciones de PCR fueron estandarizadas utilizando las siguientes concentraciones en un volumen final de 20 μl

ADN	H ₂ O	BUFFER	Mg ⁺⁺ 94°C	dNTP's	Oligo F	Oligo R	Taq
2 µl (50 ng)	c.b.p 20 µl	2 µl (1X)	1.5 µl (2 mM)	2 µl (200 µm)	1 µl 0.5 µM	1 µl 0.5 mM	0.1 µl (1U)

Sometidas en un termociclador ThermoLab, bajo las siguientes condiciones de reacción:

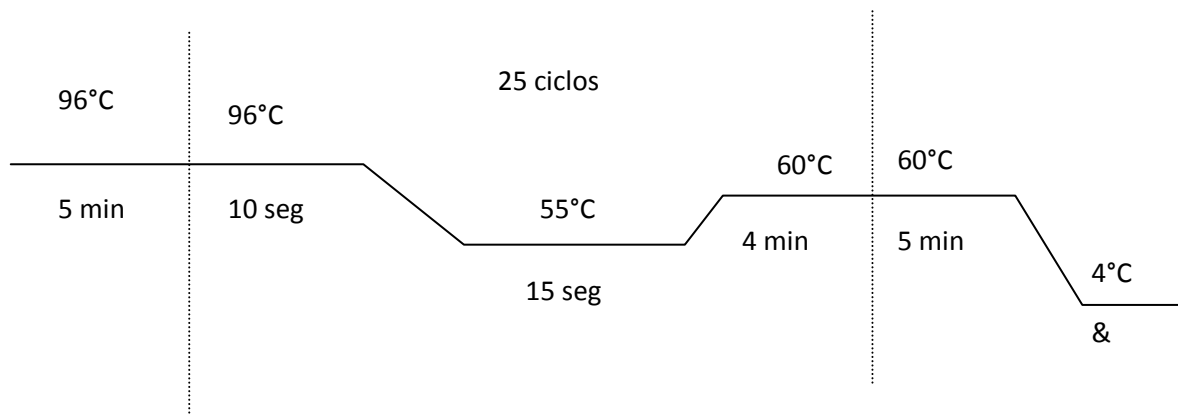


Los amplicones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa 1.5% para confirmar el tamaño deseado del fragmento (159 pb), comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen). Confirmado el amplicon se procedió a purificar 5 µl del producto que equivalían a aproximadamente 200 ng, con 1 µl de exosa a 37°C durante 15 min, inactivando la enzima a 80°C por 15 min.

El producto purificado se sometió bajo las siguientes condiciones de PCR para secuenciación

Templado	BIGDYE v3.1	H₂O
2 µl	2 µl 94°C	c.b.p 20 µl

Sometidas en un termociclador ThermoLab, bajo las siguientes condiciones de reacción:



C).-Reacción de Secuenciación

El producto obtenido se pasa por columnas de sepadex G-50 previamente hidratadas con agua estéril, se seco el producto y se sometió a un secuenciador ABI 310, con 10 seg de inyección y 30 min de análisis, para obtener los electroferogramas.

XI.- RESULTADOS

Parte de la secuencia del gen *NF1*

GCAAGCTAGCATTGAAACAATGATGTTAAATCTGGTCAGgtaagcattctactg
aa

Figura A)

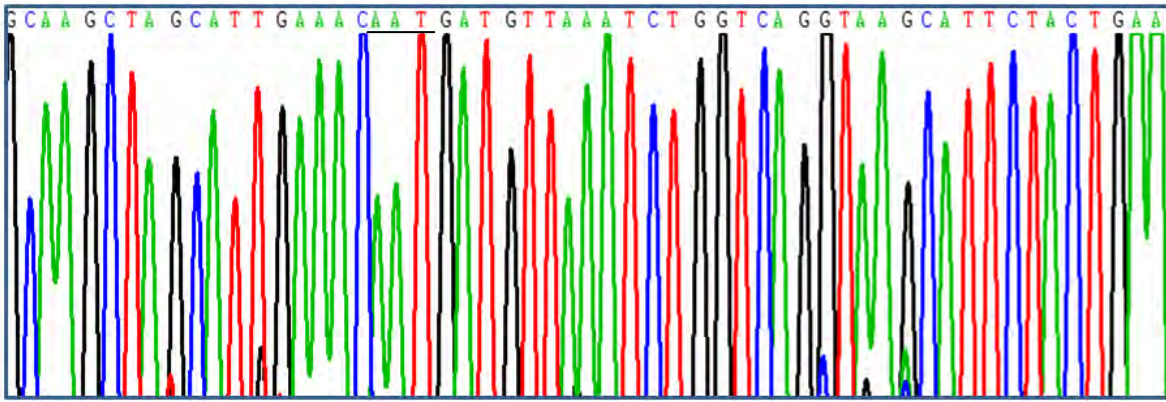


Figura A) Electroferograma de un paciente que muestra parte de la secuencia del exón 17 del gen *NF1*.

Analizamos clínicamente a un grupo de 250 pacientes con diagnóstico de *NF1*, de los cuales escogimos una muestra de seis pacientes mayores de 17 años con características de: múltiples manchas café con leche, signo de Crowe, antecedente de familiar de primer grado afectado y que carecieran de cualquier tipo de neurofibroma cutáneo, datos compatibles con la delección AAT del exón 17.

Por medio de secuenciación, no se encontró diferencia en la secuencia del exón 17, de los pacientes comparada con la del control y la base de datos, sugiriéndonos que la secuencia de los pacientes para el exón 17 corresponde a la secuencia wild type de este exón.

XII.- DISCUSIÓN

La NF1 es una patología difícil de estudiar molecularmente, debido a que el gen *NF1* tiene 60 exones y se conoce que puede presentar mutaciones en cualquiera de ellos. Hasta la fecha se han reportado alrededor de 800 mutaciones diferentes en el gen *NF1*.

Se han realizado múltiples estudios tratando de ver la correlación genotipo fenotipo, pero hasta la fecha sólo dos correlaciones de importancia clínica se han reportado en NF1:

- El síndrome de microdeleción de NF1, los cuales desarrollan un gran número de neurofibromas para su edad, rasgos dismórficos, un probable aumento de MPNST, anomalías cardíacas y sobrecrecimiento. Los problemas de aprendizaje y retraso mental son más frecuentes en este grupo de pacientes.
- La deleción c.2970-2972 AAT en el exón 17 del gen *NF1*, la cual se ha descrito en familias multigeneracionales sin neurofibromas.

En un estudio en el 2007 realizado por Upadhyaya (30), demostró que la deleción AAT en exón 17, era la mutación responsable de las

alteraciones pigmentarias de la NF1 y que carecía de cualquier tipo de neurofibromas cutáneos. Se descartó que fuera un polimorfismo al compararlo con los controles sanos dentro de la misma familia, y al observarse la mutación en afectados de diferentes familias.

Lo más sobresaliente en estos pacientes es la ausencia de neurofibromas cutáneos, subcutáneos y plexiformes. Los neurofibromas son una de las características clínicas cardinales de la NF1, están presentes en casi todos los pacientes adultos, en los que a menudo representan una causa importante de la morbilidad. Estos datos no sólo tienen aplicación clínica inmediata, en un plazo más largo pueden proporcionar una mejor comprensión de las razones biológicas por las cuales los pacientes con NF1 con la específica mutación c.2970-2972delAAT no desarrollan neurofibromas.

Se prevé que la pérdida de c.2970-2972 AAT en el exón 17 elimina una metionina, este residuo de metionina se encuentra en una región altamente conservada de neurofibromina que probablemente tiene un importante papel funcional. El resultado de la pérdida de metionina en el alelo mutado, lleva a una reducción parcial en el nivel global de neurofibromina en las células, pero no interfiere en el desarrollo de la proteína.

En un sistema de modelo murino *nf1* se demostró que es la interacción de los mastocitos haploinsuficientes con las células de Schwann completamente deficientes de neurofibromina lo que induce el desarrollo de los neurofibromas. Por tanto es posible que, en pacientes con la supresión de AAT, esta interacción celular entre las

células cebadas y células de Schwann se interrumpa dando lugar al fracaso de la formación de neurofibromas.

Aunque se carece de la frecuencia de NF1 en la población mexicana, es una de las patologías observadas comúnmente en la consulta de los servicios de genética médica y dermatología del Hospital general de México. En el presente estudio, realizamos una revisión clínica de 250 pacientes con NF1 del servicio de genética, de los cuales seleccionamos aquellos que solo presentan alteraciones pigmentarias compatibles con NF1 y que carecen de cualquier tipo de neurofibroma cutáneo. En estos pacientes realizamos el estudio molecular esperando encontrar la delección AAT en el exón 17.

Se realizó amplificación por PCR del exón 17 del gen de la NF1 en los seis casos y los controles. Las secuencias del exón 17 de los pacientes no mostraron cambios comparándolos con los controles sanos ni con la base de datos de NCBI. La ausencia de mutaciones en el exón 17 del gen *NF1*, en los presentes casos con la ausencia de neurofibromas deja expuesta la gran heterogeneidad del padecimiento, y dándonos la posibilidad de que se presente la mutación en cualquier otra región del gen *NF1*. Otro hecho es la edad de los pacientes, los cuales son pacientes jóvenes con el probable desarrollo de neurofibromas a una edad mayor, teniendo en cuenta que esto fuera un error en la selección de los pacientes. Los pacientes se revalorarán clínicamente para un probable estudio posterior de mutaciones en el gen *SPRED1*.

XIII.-GLOSARIO

Alelos

Versión específica de un gen que ocupa una localización determinada en el genoma. Se diferencia de otros alelos del mismo gen por ser distinta su secuencia de nucleótidos. En general uno de los estados alternativos de un mismo gen.

Amplificación de DNA

Proceso por el cual se generan copias de un fragmento de ADN, Puede producirse *in vivo* o realizarse *in vitro* mediante diversas técnicas.

Cromosoma

Elemento que existe en el núcleo de la célula en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

Enzima

Catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Gen

Secuencia de nucleótidos que codifica un producto funcional. Incluye regiones anteriores (5`no traducida) posteriores (3`no traducida) a la región codificante, así como secuencias interpuestas (intrones) entre exones. Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamados locus.

Genotipo

Conjunto de genes de un individuo que puede expresarse o no. La contribución genética de la descendencia. La constitución genética de un locus en particular. La constitución genética de un organismo.

Heterocigoto

Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

Homocigoto

Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

Kilodaltones

Es una pequeña unidad de masa usada para expresar masas atómicas y masas moleculares. Es definido como $1/16$ de la masa de un átomo de oxígeno.

Loci

El plural de locus.

Locus

En genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

Multifactorial

Causado por interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación enzimática de fragmentos de DNA localizado entre un par de iniciadores

Secuenciación

Secuenciación de DNA. Determinación del orden en el cual se disponen las bases de una molécula de DNA. Proceso mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos o de los aminoácidos de una molécula de ácido nucleico o proteína según sea el caso.

Taq polimerasa

Una DNA polimerasa termoestable aislada de una bacteria utilizada en PCR.

XIV.-REFERENCIAS

1. Zanca A: Antique illustrations of neurofibromatosis. *Int J Dermatol.* 19:55, 1980.
2. Hecht F: Recognition of neurofibromatosis before von Recklinghausen. *Neurofibromatosis.* 2:180, 1989.
3. Von Recklinghausen FD: Ueber die multiplen fibrome der Haut und ihre beziehung zu den multiplen neuromen. Berlin, Hirschwald, 1882.
4. Preiser SA, Davenport CB: Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease) and its inheritance. *Am J Med Sci.* 156:507, 1918.
5. Lisch K: Ueber beteiligung der augen, insbesondere das vorkommen von irisknoten bei derneurofibromatose (Recklinghausen). *Augenheilkde.* 93:137, 1937.
6. Riccardi VM: Von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med.* 305:1617, 1981.
7. Kaufmann D (ed): Neurofibromatoses. *Monogr Hum Genet.* Basel, Karger, 2008, vol 16, pp 1–20.
8. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 1990;62: 187-92.
9. M. Upadhyaya, C. Lazaro, L. Messiaen et al. An Absence of Cutaneous Neurofibromas Associated with a 3-bp Inframe Deletion in Exon 17 of the NF1 Gene (c.2970-2972 del AAT): Evidence of a Clinically Significant NF1 Genotype-Phenotype Correlation.
10. David H. Gutmann, Francis S. Collins Chapter 39: Neurofibromatosis 1 Scriver's 2010.
11. Theos A, Korf BR. Pathophysiology of neurofibromatosis type Ann Intern Med 2006;144:842-9.
12. Neurofibromatosis statement. *Arch Neurol.* 45:575, 1988.
13. Burwell RG, James NJ, Johnston DI: Café au lait spots in school children. *Arch Dis Child.* 57:631,1982.
14. Korf and Bernard L. Maria Virginia C. Williams, John Lucas, Michael A. Babcock, David H. Gutmann, Bruce Neurofibromatosis Type 1 Revisited *Pediatrics* 2009;123;124-133
15. Benedict PH, Szabo G, Fitzpatrick TB, Sinesi SJ: Melanotic macules in Albright syndrome and in neurofibromatosis. *JAMA.* 205:72, 1968
16. Lott IT, Richardson EP: Neuropathological findings and the biology of neurofibromatosis. *Adv Neurol.* 28:23, 1981.
17. Rosalie E Ferner Neurofibromatosis 1 *European Journal of Human Genetics* (2007) 15, 131–138.

18. Hilde Brems, Eline Beert, Thomy de Ravel, Eric Legius Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1 *Lancet Oncol* 2009; 10: 508–15.
19. Korf BR. Clinical features and pathobiology of neurofibromatosis *J Child Neurol*. 2002;17(8):573–577; discussion 602–604, 646–651.
20. Joseph L. Kissil, Kathryn North, et al, What's New in Neurofibromatosis? Proceedings From the 2009 NF Conference *Am J Med Genet Part A* 152A:269–283.
21. Upadhyaya M: NF1 gene structure and NF1 genotype/phenotype correlations; in Kaufmann D (ed): *Neurofibromatoses*. *Monogr Hum Genet* 2008;16:46–62.
22. Tinschert S: Clinical phenotypes in patients with NF1 microdeletions; in Kaufmann D (ed): *Neurofibromatoses*. *Monogr Hum Genet* 2008;16:78–88
23. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, et al: Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis type 1-like phenotype. *Nat Genet*
24. Viskochil DH: Gene structure and function; in Upadhyaya M, Cooper DN (eds): *Neurofibromatosis Type 1: From Genotype to Phenotype*. BIOS Publishers, Oxford, 1998, pp 39–56.
25. Gutmann D, Andersen L, Cole J: An alternatively spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. *Hum Mol Genet* 1993;2:989–992.
26. Horan MP, Osborn M, Cooper DN, Upadhyaya M: Functional analysis of polymorphic variation within the promoter and 5' untranslated region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Am J Med Genet* 2004;131:227–231.
27. Osborn M, Cooper DN, Upadhyaya M: Molecular analysis of the 5'-flanking region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene: identification of five sequence variants in NF1 patients. *Clin Genet* 2001;57:221–224.
28. De Luca A, Schirinzi A, Buccino A. et al Novel and Recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1, *Hum Mut.* 2004, 716.
29. Yoko Auki et al. The RAS/MAPK Syndromes: Novel Roles of the RAS Pathway in Human Genetic Disorders, *Human Mutation* 2008 29 (8): 992- 1006.
30. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, 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* 2007;80:140–151.
31. Arun D, Gutmann DH: Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2004;17:101–105.
32. Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aldeo R, Ars E, et al: Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two Schwann cells subpopulations. *Hum Mol Genet* 2000;9:3055–3084.

33. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF: Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 2002;296:920–922.
34. A. Allevato Neurofibromatosis Act Terap Dermatol 2005; 28: 420
35. Virginia C. Williams, John Lucas, Michael A. Babcock, David H. Gutmann Neurofibromatosis Type 1 Revisited *Pediatrics* 2009;123;124-133.