

Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y su diagnóstico molecular como estrategia del diagnóstico diferencial y a edades tempranas

MARTHA GÓMEZ^{1,a}, ORIANA BATISTA^{1,2,b}

¹Centro Especializado de Genética (CEGEN), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI), ciudad de David, provincia de Chiriquí, República de Panamá.

²Centro Gendiagnostik, S.A., ciudad de David, provincia de Chiriquí, República de Panamá.

^aLicenciada en Biología.

^bGeneticista clínica molecular, M.Sc., Dr.rer.nat.

Fuente de apoyo financiero:

Este artículo fue financiado por el Centro Gendiagnostik, el Sistema Nacional de Investigación (SNI), la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT/ APY-NI10-002 A) y la Vicerrectoría de Investigación y Posgrado de la UNACHI (VIP 184-CN-01-A092-022011).

Recibido el 22 de noviembre de 2014, aceptado el 9 de julio de 2015.

Correspondencia a:

Dra. Oriana Batista
Centro Gendiagnostik, Avenida Domingo Díaz y Calle Central.
Ciudad de David, provincia de Chiriquí, República de Panamá.
Apdo. postal: 0426-01262.
Telefax: (507)-7742871
jbbo@gmx.net

Molecular diagnosis as a strategy for differential diagnosis and at early ages of neurofibromatosis type 1 (NF1)

Neurofibromatosis type 1 (NF1), is a haploinsufficient and multisystemic disease, caused by inherited or sporadic mutations in the NF1 gene. Its incidence is one in 2,500 to 3,000 individuals, it has an autosomal dominant pattern of inheritance, high clinical variability, complete penetrance and age-dependent complications. Neurofibromin is the product of the NF1 gene and is believed to act as a tumor suppressor since the loss of its function has been associated with benign and malignant tumors in neural crest-derived tissues. Only two correlations between clinical phenotype and mutant alleles in the NF1 gene have been observed. The established criteria for disease diagnosis are very efficient in adults and children older than 3 years of age, but not for children under this age. Mutational analysis is therefore recommended to confirm the disease in young children with a negative family history. A pathogenic mutation in the NF1 should be added to the list of diagnostic criteria. Mutational analysis is also recommended for differential diagnosis and for prenatal or pre-implantation genetic diagnosis, taking into consideration the family history and the type of method to be applied. Molecular studies of this disease using different complementary molecular techniques and bioinformatics tools have characterized NF1 gene mutations at both the DNA and mRNA levels, increasing the mutational spectrum. Consequently, about 1,289 defects have been reported to date, mainly nonsense/missense mutations, deletions and splice site defects.

(Rev Med Chile 2015; 143: 1320-1330)

Key words: Child; Computational Biology; DNA Mutational Analysis; Neurofibromatosis 1; Neurofibromin 1.

La Neurofibromatosis tipo 1 (NF1; MIM #162200), es un desorden con patrón de herencia autosómico dominante e incidencia de 1 en 2.500 a 3.000 individuos¹. Es una enfermedad multisistémica ocasionada por mutaciones heterogéneas en el gen *NF1*, las cuales son esporádicas en, aproximadamente, 50% de los casos². *NF1* fue identificado y su proteína ca-

racterizada, por Cawthon y cols. y Wallace y cols., respectivamente, en 1990. La secuencia del ADNc fue descrita por Gutmann y Collins y Viskochil y cols., en 1993³.

A pesar de que, aproximadamente, 1289 mutaciones han sido reportadas (HGMD-Human Gene Mutation Database), pocas son las relaciones genotipo-fenotipo, descritas.

NF1 se caracteriza por extrema variabilidad clínica entre individuos afectados no relacionados, entre miembros afectados de una familia, y en una persona en diferentes etapas de su vida. Adicionalmente, la frecuencia de complicaciones se incrementa con la edad³.

El diagnóstico clínico de los pacientes con NF1, se basa en los criterios establecidos en la conferencia para el desarrollo de consensos del Instituto Nacional de Salud (siglas en inglés NIH), en 1988⁴, los cuales toman en consideración la condición de afectación de piel, huesos y sistema nervioso, principalmente. Aunque estos criterios resultan ser altamente específicos y sensitivos en adultos⁵, no se presentan en algunos niños menores de 8 años⁶. Para este último grupo, el diagnóstico molecular sería útil, pues aproximadamente, la mitad de aquellos que están afectados y no presentan antecedentes familiares, reúnen los criterios para el diagnóstico al año de edad, y la mayoría de ellos, cumplirán con éstos a los 8 años.

Aunque en algunos laboratorios el diagnóstico genético de NF1 es rutinario, algunos factores tales como su gran tamaño, la carencia de sitios específicos de mutación y la presencia de pseudogenes, hacen laboriosa la identificación de mutaciones en *NF1*. A continuación, se presenta una revisión de algunos aspectos moleculares de la NF1, sus características genéticas, manifestaciones, criterios para el diagnóstico clínico, y algunos estudios mutacionales del gen. Adicionalmente, se muestra la utilidad del análisis mutacional como aporte al diagnóstico en niños menores, al diagnóstico diferencial de la enfermedad y al pre-natal y/o preimplantacional.

El gen *NF1* codifica la proteína neurofibromina, asociada con la supresión tumoral

El gen *NF1* se localiza en el cromosoma 17q11.27-9, tiene un tamaño genómico de 282,751 pb, 60 exones, y codifica al menos tres transcritos solapados¹⁰. Cuatro exones alternativamente empalmados¹¹ y pseudogenes en los cromosomas 2, 14, 15, 18, 21 y 22³ han sido descritos. Adicionalmente, en el intrón 27 se localizan los genes *EVI2A*, *EVI2B* (*ecotropic viral integration site 2A y 2B*) y *OMGP* (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) que se transcriben en dirección opuesta al *NF1*¹²⁻¹⁴.

La transcripción de *NF1* ocurre en dirección centrómero-telómero, y genera un ARNm de 11

a 13 kb, con un marco de lectura abierto de, aproximadamente, 9 kb. Su producto proteico, neurofibromina, tiene 280 kDa y expresión ubicua¹¹ en fibroblastos de piel, cerebro, bazo, pulmón, músculo, neuroblastoma, neurofibroma, células de neurofibrosarcoma NF1, carcinoma de colon y cáncer de mama, entre otros^{8,15,16}.

La función de los 3 dominios que forman la proteína¹⁷⁻¹⁹ se comprende parcialmente. El dominio GRD (*GAP-related domain*) de, aproximadamente, 360 aminoácidos, ubicado en la región central de la neurofibromina y determinado por los exones 20 a 27a, muestra homología estructural y funcional con la familia de proteínas activadoras de GTPasa (GAP). Este dominio interactúa con la proteína ras-GTP y promueve la conversión de ras-GTP a su forma inactiva ras-GDP regulando negativamente la vía de señalización p21ras^{17,20,21}. Consecuentemente, a la neurofibromina se le considera un supresor tumoral²², pues la reducción de su producción (en células haploinsuficientes) o la completa pérdida de ésta, conlleva la activación de la proteína ras, que a su vez regula una cascada de vías de señalización posteriores, entre ellas, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (PKB) y proteína quinasa diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)³. La activación de estas vías, ocasiona una variedad de efectos celulares que, generalmente, estimulan la supervivencia y proliferación celular²³ (Figura 1).

La pérdida de la función de esta proteína, se asocia con tumores benignos y malignos encontrados en tejidos derivados de la cresta neural²⁴. Así, generalmente, en ausencia o reducción drástica de la neurofibromina, se pueden encontrar niveles elevados de ras-GTP en tumores de los nervios periféricos de pacientes con NF1²⁵. El aumento del riesgo de tumores malignos en NF1, es compatible con la pérdida de función de la neurofibromina, como regulador negativo del oncogén ras²¹.

Los otros dominios potenciales funcionales en la neurofibromina son: un dominio rico en residuos de cisteína y serina (CSRD) entre el exón 11 y 17 que codifica varios sitios de reconocimiento para proteína quinasa dependiente de AMP cíclico¹⁸, y el dominio NF1-Sec-PH relacionado con la unión a fosfolípidos¹⁹. Interacciones directas o indirectas entre la neurofibromina y otras proteínas, también han sido documentadas, aunque no se conoce su significado biológico²⁶.

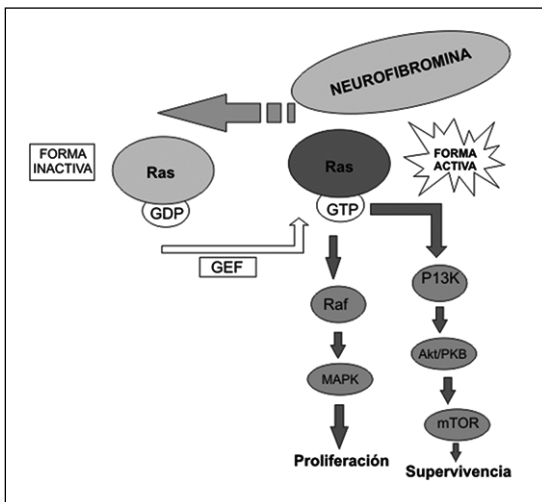


Figura 1. La neurofibromina actúa como regulador negativo de la vía de señalización Ras, promoviendo su forma inactiva Ras-GDP. La neurofibromina es un tipo de proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP) que se une a la forma activa de la proteína ras (ras-GTP) y la inactiva (ras-GDP) y, consecuentemente, no hay proliferación ni supervivencia celular alterada. Los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) realizan el paso contrario, reactivando a Ras al promover el intercambio de GDP a GTP. La pérdida de la función de la neurofibromina, en individuos NF1 heterocigotos y homocigotos evita la conversión de Ras-GTP a Ras-GDP, y esto a su vez, desencadena cascadas de señalización posteriores con efectos de supervivencia y proliferación celular, entre otros (ver texto para información detallada). Abreviaturas: Ras-GDP, forma inactiva de la proteína Ras unida a guanosín difosfato. Ras-GTP: forma activa de la proteína Ras unida a guanosín trifosfato. Raf: serina-treonina proteína cinasa. MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos. P13K: fosfoinositol 3-cinasas. Akt/PKB: proteína cinasa B. mTOR: proteína cinasa diana de rapamicina en células de mamífero.

La NF1 se hereda de forma autosómica dominante, su fenotipo es variable y completamente penetrante

La pérdida de función de un gen es causada por mutaciones que interrumpen su capacidad codificante²⁷. NF1 exhibe un patrón de herencia autosómico dominante, los individuos afectados tienen un genotipo heterocigoto y la descendencia de éstos tiene 50% de riesgo de heredar el gen alterado²⁸. La mutación en los individuos heterocigotos causa haploinsuficiencia, y por ello, la única copia funcional no produce suficiente neurofibromina para asegurar un desarrollo y crecimiento celular normal²⁶. No existen individuos

homocigotos²⁶ y los ratones homocigotos (*Nf1*^{-/-}) mueren en el útero, lo cual indica la importancia vital de la neurofibromina^{29,30}. La penetrancia de NF1 es 100%²⁶ y se completa, esencialmente, entre los cinco y ocho años de edad^{6,40}.

NF1 tiene una de las tasas de mutación más altas y las mutaciones esporádicas ocurren casi en la mitad de los pacientes afectados^{31,32}. Las mutaciones esporádicas en NF1 de la línea germinal, están sesgadas hacia el sexo. De éstas más de 80% tienen un origen paterno³³. Otras mutaciones, llamadas microdeleciones del locus, tienen, en su mayoría, un origen materno³⁴, abarcan, aproximadamente, 1,5 Mb e incluyen NF1 y regiones flanqueadoras³⁵.

Gran variabilidad fenotípica entre pacientes con NF1, se aprecia intra e inter-familiarmente, aún cuando se presentan mutaciones idénticas en el gen³⁶. Entre familias de Corea con la misma mutación, se observó que unos miembros manifestaron patologías malignas y otros menos severas. Intra-familiarmente, aunque madre e hija presentaron una deleción, del exón 2 al 47 (c.61-8315del), la primera, de 29 años, desarrolló sólo manifestaciones cutáneas, y la segunda, de 6,2 años, glioma cerebral, pseudoartrosis severa de tibia y escoliosis³⁷.

Esta expresividad variable, podría deberse al efecto de genes modificadores o mutaciones somáticas secundarias dentro de los tejidos tumorales^{38,39}. Adicionalmente, variantes de un gen podrían afectar la estructura y función de la proteína, y ocasionarían, así, fenotipos variables⁴⁰.

Sólo dos correlaciones genotipo-fenotipo, las cuales, también, son ejemplos de la variabilidad fenotípica de NF1 han sido observadas: 1) la deleción completa del gen, microdeleciones NF1, caracterizada por la aparición temprana y numerosa de neurofibromas cutáneos, con mayor frecuencia y la severidad de anomalías cognitivas, malformaciones, tumoración y riesgo aumentado de malignización^{41,42}; y 2) la deleción específica de tres pb en el exón 17, c.2970-2972 delAAT (p.990delM), asociada con pigmentación, nódulos de Lisch y ausencia de neurofibromas cutáneos o neurofibromas plexiformes⁴⁰.

Las manifestaciones clínicas como criterios para el diagnóstico

El diagnóstico de pacientes con NF1 se basa, primordialmente, en los criterios NIH⁴ (Tabla 1),

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico clínico de la Neurofibromatosis tipo 1

• Seis o más manchas café con leche mayores de 5 mm en pacientes prepuberales y mayores de 15 mm en pacientes postpuberales
• Dos o más neurofibromas de cualquier tipo o un neurofibroma plexiforme
• Signo de Crowe (efélides axilares o inguinales)
• Glioma de nervio óptico
• Dos o más nódulos de Lisch (hamartomas de iris)
• Lesiones óseas típicas (displasia del esfenoides, displasia o adelgazamiento cortical de huesos largos con o sin pseudoartrosis)
• Antecedentes de neurofibromatosis tipo I en padres o hermanos

Si 2 o más de estos criterios son encontrados en un individuo se realiza el diagnóstico de NF1.

pero también en otras manifestaciones, con frecuencia media y ocasional, abajo mencionadas⁵. Éste requiere de un examen clínico cuidadoso del paciente, sus padres, hermanos y una historia familiar detallada, que incluya información clínica y en ocasiones exámenes complementarios⁴³.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con NF1 son las alteraciones en las manifestaciones de la piel (más de 99%), neurofibromas cutáneos (más de 99%)[5 en superíndice], nódulos de Lisch (de 90-95%) y efélides (85%)^{3,40}. Otras complicaciones en diversos sistemas podrían presentarse. Las discapacidades de aprendizaje, desarrollo de anomalías esqueléticas, enfermedades vasculares, tumores del sistema nervioso central o malignos de la vaina de los nervios periféricos se presentan con frecuencia³. Algunas complicaciones raras, que afectan a menos de 5% de los pacientes incluyen epilepsia, hidrocefalia, problemas cardiovasculares y escoliosis distrófica⁴⁴.

Los tumores del sistema nervioso central y los neurofibromas podrían resultar en importante morbilidad y mortalidad⁴⁵ y reducir la esperanza media de vida de las personas con NF1 en, aproximadamente, 15 años. Las causas más importantes de muerte temprana son las manifestaciones malignas y enfermedades vasculares^{3,36,46}. Individuos entre 20-35 años tienen 8-13% de riesgo de desarrollar tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, predominantemente⁴⁷, los cuales son

difíciles de detectar, fácilmente metastásicos y a menudo de mal pronóstico⁴⁸.

Fenotipos leves de NF1 son causados por mosaicismo originado por mutaciones después de la fertilización²⁶ y se clasifican como segmentario, generalizado, o gonadal⁴⁹. El generalizado es clínicamente similar a la NF1 clásica, pero se presenta poca o ninguna evidencia de la enfermedad al examinar los leucocitos sanguíneos para detectar mutaciones. El segmentario ocasiona regiones con alteraciones pigmentarias, crecimientos tumorales, o ambos, limitados a una o más regiones del cuerpo⁵⁰. El gonadal, causa mutaciones en las gónadas, y puede deducirse cuando dos o más hijos de padres no afectados desarrollan la enfermedad⁵¹.

Utilidad del análisis mutacional para el diagnóstico de la NF1 en niños menores, en el diagnóstico diferencial y en el diagnóstico prenatal o preimplantacional

El análisis mutacional es, especialmente, útil en niños pequeños con historia familiar negativa y que llenan parcialmente los criterios de diagnóstico NIH, en niños con presentaciones atípicas³, en el diagnóstico diferencial o en el diagnóstico genético prenatal o preimplantacional^{5,50}.

Aunque los criterios de diagnóstico NIH son útiles para la detección de NF1, algunos de éstos se manifiestan a una edad superior a los 3 años y están presentes al nacimiento sólo en algunos pacientes⁵. Por ello, el diagnóstico definitivo, usando dichos criterios puede ser realizado, para la mayoría entre los cuatro y cinco años^{28,40}. Aproximadamente 46% de los casos esporádicos de NF1, no cumplen con dichos criterios a la edad de un año⁶.

Seis o más manchas café con leche se presentan desde el nacimiento, en más de 99% de los casos con NF1 y este criterio es el más frecuente^{5,6} y altamente sugestivo de la enfermedad⁵². Sin embargo, aproximadamente, 1% de los niños que manifestarán la enfermedad a edades superiores, podrían presentar un número inferior a seis manchas, lo cual no ayudaría en el diagnóstico clínico, pues menos de 1% de los niños menores de 5 años sin NF1, presentan más de dos manchas⁵². Otros infantes, cuyos padres no muestran signos de NF1, muestran manchas café con leche, sin otras manifestaciones³.

La prevalencia de la NF1 en Irlanda del Norte, en menores de 16 años⁵³, fue 17,6 por cada 100.000 (1 en 5.681) niños y éstos desarrollaron numerosas complicaciones. Las más frecuentes, desde el nacimiento, incluyen dificultades de aprendizaje (30-60%), neurofibromas plexiformes (30-50%), escoliosis (10%)⁵ y glioma del nervio óptico (15-20%)^{5,36}. Estos últimos, se presentan antes de los seis años, pero podrían volverse sintomáticos en la infancia tardía o la adultez y causar ceguera²⁸.

Un análisis mutacional exhaustivo permitiría identificar mutaciones en un poco más de 92% de pacientes que cumplen con los criterios NIH^{54,55}. Este análisis, además, de permitir la confirmación del diagnóstico de NF1, facilitaría la identificación de las mutaciones en el afectado, útiles para diagnósticos pre-natales y pre-implantacionales de su futura descendencia debido a que sólo 50% de ésta tiene la probabilidad de tener la enfermedad. Mientras que el resultado del diagnóstico pre-natal podría sugerir a la pareja la interrupción terapéutica del embarazo, el diagnóstico pre-implantacional podría evitarlo⁵⁶.

Los estudios mutacionales apoyarían, también, el diagnóstico diferencial de la NF1 respecto a síndromes como Noonan, LEOPARD, síndrome cardiofaciocutáneo, Costello, Legius, entre otros^{3,26}. Estas condiciones comparten un grado variable de dificultad de aprendizaje, defectos cardíacos, dimorfismo facial, baja estatura, macrocefalia y anomalías de la piel⁵⁷. Por ejemplo, pacientes con fenotipo leve, quienes cumplen con los criterios para NF1, podrían padecer el síndrome Legius, caracterizado por mutación en *SPRED1*⁵⁸. Aproximadamente, 1 a 2% de pacientes que cumplen con los criterios de diagnóstico NF1, presentan mutaciones en *SPRED1*⁵⁹.

En resumen, todos los pacientes con mutación en *NF1* manifestarán la enfermedad debido a que la penetrancia de NF1 es 100%²⁶, pero no todos cumplirán con los criterios NIH antes de los cuatro o cinco años. Algunos pacientes que llenan estos criterios y exhiben fenotipos leves podrían presentar otros síndromes. Por estas razones, los estudios mutacionales pueden proveer información oportuna y una confirmación del diagnóstico clínico para un manejo personalizado del paciente. Adicionalmente, la información generada, mediante estos análisis, sería útil para los diagnósticos pre-natales, pre-implantacionales y las asesorías genéticas. Así, la idea de modificar⁶

e incluir la presencia de una mutación patogénica a los criterios NIH^{50,57} para facilitar el diagnóstico a edades muy tempranas es razonable. El aumento en la cantidad de estudios de diagnóstico molecular y en el número de mutaciones, también, demuestra la utilidad de los mismos para confirmar el diagnóstico clínico.

Panorama del análisis mutacional en *NF1*

La determinación de mutaciones en *NF1* más que compleja es laboriosa, debido a numerosos exones codificantes, heterogeneidad mutacional, tamaño del gen y la ausencia de “puntos calientes”⁵⁹⁻⁶¹. El reporte de mutaciones, ha aumentado desde 1992, cuando se creó el *International NF1 Genetic Analysis Consortium* con la finalidad de detectar las mutaciones y organizar la información creciente en bases de datos¹⁸. Así, en el consorcio se reportaron más de 100 mutaciones en la línea germinal en 1996⁶² y 240 en 1997⁶³. HGMD (*Human Gene Mutation Database*), reportó más de 400 mutaciones en 2004⁶⁴ y más de 1.289, que incluyen mutaciones sin sentido, con sentido equivocado, errores de empalme; deleciones, inserciones e indels pequeñas; deleciones e inserciones gruesas; complejos y repeticiones en mayo de 2015.

Diversas técnicas moleculares utilizadas en estudios provenientes de países como Alemania¹⁸, Italia^{60,65,66}, España^{22,61}, Brasil⁶⁴, Cuba⁶⁷, Corea³⁷ y Estados Unidos de Norteamérica⁶⁹, ofrecen un amplio rango de sensibilidad para la detección de mutaciones en *NF1*. Las mismas, se pueden identificar en aproximadamente, 85-95% de los casos, utilizando una combinación de técnicas moleculares⁵. El porcentaje de sensibilidad mayor, 95%, se obtuvo al utilizar las técnicas combinadas MLPA, RT-PCR, DHPL y secuenciación²² (Tabla 2).

Entre los métodos utilizados en los estudios anteriores figuran los de barrido tales como: SSCP, TGGE, DHPLC y PTT y otros a saber: secuenciación, qPCR, RT-PCR, MLPA y FISH (Tabla 2). Algunos laboratorios utilizan los métodos “de barrido”, para minimizar los costos, pues aunque éstos no identifican el tipo de mutación, permiten descartar los exones normales, de los exones mutados en aquellos genes con heterogeneidad alélica fuerte, es decir, con posibilidad de mutaciones a lo largo de todo el gen. La detección exacta de la mutación debe realizarse, posteriormente,

Tabla 2. Resumen de algunos estudios moleculares para determinar las mutaciones en el gen *NF1*

# Indiv.	Casos (F/E)	Técnica(s)	% de efectividad	Nivel estudiado	Variantes encontradas/ tipo más frecuente*	Mutaciones nuevas	**Mutación(es) más frecuente (s)/loc./ # de pacientes	Ref.
521	-	PTT, TGGE, SEC	40/85 (47,1%) 65/121 (53,7%) 184/335 (54,9%)	ADN ARNm Proteína	301; 278 patogénicas: 84 mutaciones sin sentido/(30,2%)*, 78 del., 32 ins., 30 por pérdida de exones <i>out of frame</i> , 25 por pérdida de exones <i>in frame</i> , 28 con sentido equivocado y 1 mutación en el codón 1	216	C4537T(R1513X) /exón 27a/7 499delTGTT /exón 4b/6 6789delTTAC /exón 37/5	18
474	63/127	cDNA-SSCP/ HD	189/474 (39,9%)	ADN ARNm	142; 70 del. e ins./ (49,3%)*, 44 de empalme, 12 sin sentido, 14 con sentido equivocado, 2 deleciones de aminoácidos	104	910C>T (R304X) /exón7/7 6792C>A (Y2264X) /exón 37/6	61
40	15/25	PCR-DHPLC, SEC	29/40 (72,5%)	ADN	29; 9 mutaciones sin sentido/(31%)*, 8 del., 6 con sentido equivocado, 4 de empalme, 1 ins. y 1 rearrreglo complejo	18	499delTGTT /exón 4b/2 6709C>T (R2237X) /exón 36/2	65
110	-	PTT, DHPLC, SEC	90/110 (81,8%)	ADN ARNm Proteína	90; 75 patogénicas: 25 mutaciones sin sentido/(33%)*, 20 del., 5 ins., 6 por pérdida de exones <i>out of frame</i> , 4 rearrreglos complejos, 1 dup. en tandem, 3 por pérdida de exones <i>in frame</i> , 10 con sentido equivocado y 1 del. pequeña dentro del marco de lectura	22	c.495_498delTGTT/exón 4b/ 3 c.3916C>T (R1306X)/exón 23-1/3 c.6709C>T (R2237X)/exón 36/3	60
55	33/22	PCR-SSCP, SEC	9/55 (16,4%)	ADN	9; 4 patogénicas: 1 mutación sin sentido, 1 con sentido equivocado, 1 del. y 1 en sitio aceptor de empalme	3	3565C>T (Q1189X) /exón 21/1 3525-3526delAA /exón 21/1 4067A>G (E1356G) /exón 23.2/1 c.4111-1G>A /intrón 23.2/1	64
63	6/17	MLPA, qPCR, FISH	23/63 (36,5%)	ADN Cromosomas	23; 9 del. de todo el gen/(39%)*, 8 del. multi-exón, 6 del. de único exón	22	Del. todo el gen tipo I/6 Del. exones 3 y 4a/3	66

# Indiv.	Casos (F/E)	Técnica(s)	% de efectividad	Nivel estudiado	Variantes encontradas/ tipo más frecuente*	Mutaciones nuevas	**Mutación(es) más frecuente(s)/loc./# de pacientes	Ref.
42	1/1	Cariotipo de alta resolución	2/42 (4,7%)	Cromosoma	2: 1 inserción, 1 del. de todo el gen	-	ins (2; 17) (q33; q11.2q12)/1 del (17 q11.2)/1	67 22
56	10/46	MLPA, RT-PCR, DHPLC, SEC	53/56 (95%)	ADN ARNm	53: 16 mutaciones sin sentido/(30.2%)*, 15 del., inserciones o duplicaciones pequeñas de 1 o varios nucleótidos, 11 de empalme, 6 del. de todo el gen, 3 con sentido equivocado, 1 del. de único exón, 1 del. multi-exón	23	Del. todo el gen/6 c. 2033_2034insC /exón 13/2 c.3826C>T (Arg1276X) /exón 22/2 c.4537C>T (Arg1513X) /exón 27a/2	66
78	47/31	SEC, RT-PCR, MLPA, FISH	52/78 (66,7%)	ADN ARNm Cromosoma	52: 18 mutaciones sin sentido/(34.6%)*, 12 con sentido equivocado, 11 de empalme, 7 del. e ins. pequeñas, 4 deleciones gruesas de más de 1 exón	16	c.1A >G(M1V) /exón 1/3 c.2033_2034insC /intron 13b/2 c.2540T>C(L847P) /exón 16/2 c.4537C>T(R1513X) /exón 27a/2 c.5546G>A(R1849Q) /exón 29/2 c.6792C>A(Y2264X) /exón 37/2 c.6792C>G(Y2264X) /exón 37/2	37
378	-	RT-PCR, SEC, qPCR	169/378 (44,7%)	ADN ARNm	127: 33 mutaciones sin sentido/(26%)*, 32 de empalme, 27 con sentido equivocado, 23 del., 8 ins/dup, 4 indels	54	-	69

Abreviaturas: DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography; PTT: Protein Truncation Test; PCR: Polymerase Chain Reaction; SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism; TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis; SEC.: secuenciación; MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; qPCR: Quantitative PCR; FISH: Fluorescent in Situ Hybridization; RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; HD: heteroduplex; in frame: dentro del marco de lectura traslacional; of frame: fuera del marco de lectura traslacional; ADN: Ácido Desoxirribonucleico; ARNm: ARN mensajero; cDNA: ADN copia; del.: deleción; ins.: inserción; dup.: duplicación; q: brazo largo del cromosoma; A: Adenina; C: Citocina; G: Guanina; T: Timina; Y: Tirosina; R: Arginina; Q: Glutamina; L: Leucina; P: Prolina; M: Metionina; V: Valina; E: Ácido Glutámico; G: Glicina; Arg: Arginina; X: Stop. Indiv.: Individuos; F: Familiar; E: Esporádico; loc.: localización; **Se mantuvo la notación para la escritura de las mutaciones, utilizada en el artículo original; *Tipo de mutación más frecuente; -: Información no disponible.

mediante secuenciación⁶⁸, técnica que utiliza, frecuentemente, ADN genómico o ADN copia obtenido por RT-PCR, para detectar mutaciones puntuales que oscilan entre una base y algunas decenas de bases. Otros laboratorios con mayor facilidad económica o que conocen la mutación puntual existente en la familia utilizan la secuenciación como primera alternativa y esta práctica ha aumentado debido a la disminución de los costos asociados a la secuenciación en los últimos años. El MLPA, FISH, cariotipos, y métodos de análisis de múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se utilizan para identificar mutaciones gruesas, es decir aquellas que involucran segmentos grandes incluso varios genes, y por lo tanto, permiten la detección de la delección completa del gen, delección de exones, duplicaciones y rearrreglos cromosómicos.

El porcentaje de detección de mutaciones varía de acuerdo con los protocolos de análisis utilizados. Mientras que el protocolo de varios pasos, basado tanto en la secuencia del ADNc, ADN genómico, así como la delección completa de *NF1* identifica más de 95% de los casos, el de la secuencia genómica, únicamente, identifica, aproximadamente, 61%. El análisis de delecciones y duplicaciones, determina aproximadamente, 5% y el citogenético menos de 1%²⁸.

Abundantes mutaciones (Tabla 2) fueron localizadas uniformemente en *NF1*, desde el exón 1 al 47^{18,37} y decayeron en densidad en los últimos exones²². El tipo de mutación más frecuente fue la sin sentido, producida por la introducción de un codón de parada prematuro, que a menudo altera el empalme del ARNm²⁸ y origina formas truncadas de neurofibromina, observadas en 80%¹⁸, 77%⁶¹, 81%⁶⁰, 76,9%³⁷ y 72%²² de los casos.

Aunque las mutaciones sin sentido causan la terminación prematura de la proteína, las delecciones e inserciones pequeñas generan transcritos con corrimiento de lectura que, también, podrían producir proteínas truncadas. Igualmente, las mutaciones en sitios de empalme y delecciones gruesas en el gen, pueden generar proteínas acortadas³⁷.

Mutaciones con sentido equivocado, las cuales producen sustitución de aminoácidos, en sitios conservados dentro de la proteína^{18,37,69}, también, se reportaron y por la ubicación de su ocurrencia podrían resultar en un cambio funcional⁶⁹. Delecciones completas del gen, se han encontrado, generalmente, entre 4-5% de los individuos con

*NF1*⁷⁰. Otros estudios mostraron porcentajes similares 4,5%⁶⁶, o aproximados 11%²², 1,59%⁶⁹.

Herramientas y bases de datos bioinformáticas han sido utilizadas para caracterizar mutaciones en *NF1*: para el modelado molecular^{60,64}, diseño de oligonucleótidos^{64,65} y determinación de mutaciones^{22,40,69}. En la actualidad se utilizan herramientas computacionales para determinar los mecanismos de errores de empalme, la patogenicidad de las mutaciones y el alineamiento de proteínas⁶⁹.

En resumen, la existencia de varios métodos moleculares así como el cúmulo de herramientas bioinformáticas aunadas a una estrategia metodológica bien planificada para la identificación de mutaciones en *NF1*, permitirá su identificación sin mayor dificultad. En este contexto, se sugiere considerar los siguientes aspectos: análisis de la región codificante y las regiones limítrofes exón-intrón, aplicación de métodos para detectar variables puntuales y gruesas, usar la secuencia de referencia genómica correcta, evaluar los antecedentes e historia familiar del paciente y el tipo de mutación a determinar y evitar la aplicación paralela de técnicas para ahorrar costos. Es preferible aplicarlas de manera paulatina hasta encontrar la mutación.

Agradecimientos: Extendemos un sincero agradecimiento al Centro Gendiagnostik, principal patrocinador de este artículo de revisión, así como la SENACYT, que a través de su plataforma ABC, desde la UNACHI, se permitió la descarga gratuita de numerosos artículos desde el portal ScienceDirect, haciendo la búsqueda bibliográfica más productiva.

Referencias

1. Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, MD, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997; 278 (1): 51-7.
2. Huson SM. Neurofibromatosis: historical perspective, classification and diagnostic criteria. *The Neurofibromatoses: A Pathogenic and Clinical Overview*. Edited by SM Huson, RAC Hughes. London, Chapman & Hall Medical, 1994. P. 1-22.
3. Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med* 2010; 12: 1-11.
4. NIH Consensus Development Conference. Neurofibro-

- matosis Conference Statement. *Arch Neurol* 1988; 45: 475-578.
5. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2007; 44: 81-8.
 6. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000; 105(3): 608-14.
 7. Cawthon R, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 1990; 62: 193-201.
 8. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990; 249: 181-6.
 9. 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.
 10. Viskochil DH. Gene structure and function. *Neurofibromatosis Type 1: From Genotype to Phenotype*. Edited by M Upadhyaya, DN Cooper. Oxford, BIOS Publishers, 1998. p. 39-56.
 11. Upadhyaya M. NF1 gene structure and NF1 genotype/phenotype correlations. In: *Neurofibromatosis*. Edited by D Kaufmann. Basel, Karger, 2008. p. 46-62.
 12. Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss R, Culver M, et al. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics* 1990; 7: 555-65.
 13. Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, et al. cDNA sequence and genomic structure of Evi2B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 1991; 9: 446-60.
 14. Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P, Xu G, Stevens J, Culver M, et al. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 906-12.
 15. Nishi T, Lee PSY, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, et al. Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene* 1991; 6: 1555-9.
 16. Suzuki Y, Suzuki H, Kayama T, Yoshimoto T, Shibahara S. Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcripts containing the 63-base insert in the region coding for GTPase activating protein-related domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 955-61.
 17. Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, et al. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 1990; 63: 851-9.
 18. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 790-818.
 19. D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep* 2006; 7 (2): 174-9.
 20. Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990; 63: 843-9.
 21. Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, et al. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complement IRA mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 1990; 63: 835-41.
 22. Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, Valero AM, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn* 2011; 13 (2): 113-22.
 23. Denayer E, de Ravel T, Legius E. Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet* 2008; 45: 695-703.
 24. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 2009; 123 (1): 124-33.
 25. Guha A, Lau N, Huvar I, Gutmann D, Provias J, Pawson T, et al. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 1996; 12: 507-13.
 26. Jouhilahti E-M, Peltonen S, Heape AM, Peltonen J. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *Am J Pathol* 2011; 178 (5): 1932-9.
 27. Novo Villaverde FJ. Efectos fenotípicos de las mutaciones. En: Martín-Romo M, Caicoya M, Editores, *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*. Madrid, España. Pearson Educación, S.A.; 2007. p. 211-3.
 28. Friedman JM. Neurofibromatosis 1. 1998 oct 2 [updated 2014 sep 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1109/>
 29. Brannan C, Perkins A, Vogel K, Ratner N, Nordlund M,

- Reid S, et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 1994; 8: 1019-29.
30. Jacks T, Shih T, Schmitt E, Bronson R, Bernards A, Weinberg R. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *Nf1*. *Nat Genet* 1994; 7: 353-61.
 31. Valero MC, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, Moreno F, Hernández-Chico C. Identification of de novo deletions at the *NF1* gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Human Genetics* 1997; 99 (6): 720-6.
 32. Upadhyaya M, Cooper DN. The mutational spectrum in neurofibromatosis 1 and its underlying mechanisms. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publishers, Oxford; 1998. p. 65-88.
 33. Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M, Ponder M, Huson S, Carey J, et al. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 1990; 343: 558-9.
 34. Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, et al. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* 1998; 102: 591-7.
 35. De Raedt T, Brems H, López-Correa C, Vermeesch J, Marynen P, Legius E. Genomic organization and evolution of the *NF1* microdeletion region. *Genomics* 2004; 84: 346-60.
 36. Rasmussen SJ, Friedman JM. *NF1* gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 33-40.
 37. Ko JM, Sohn YB, Jeong SY, Kim HJ, Messiaen LM. Mutation spectrum of *NF1* and clinical characteristics in 78 Korean patients with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Neurol* 2013; 48: 447-53.
 38. Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BAJ. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (*NF1*): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 305-13.
 39. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2768-78.
 40. Upadhyaya M, Huson S, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, 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: 140-51.
 41. Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, et al. *NF1* microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2010; 31 (6): E1506-18.
 42. Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammer S, Högel J, et al. Clinical characterization of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 *NF1* deletions. *J Med Genet* 2010; 47 (9): 623-30.
 43. Trovó AB, Goloni-Bertollo EM, Tajara EH. Neurofibromatose tipo 1: uma revisao. *HB Científica* 2002; 9: 98-110.
 44. Ferner R: The neurofibromatoses. *Pract Neurol* 2010; 10: 82-93.
 45. Rodillo E, Fruns M, Ferrada MJ, Demarta JC, Adlerstein L. Neurofibromatosis tipo I: una enfermedad de manifestaciones heterogéneas. *Rev Chil Pediatr* 1996; 67 (1): 1-5.
 46. Zoller M, Rembeck B, Akesson HO, Angervall L. Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1. A twelve-year follow-up of an epidemiological study in Goteborg, Sweden. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 136-40.
 47. Evans DG, Baser ME, McLaughran J, Sharif S, Howard E, Morán A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2002; 39: 311-4.
 48. Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res* 2002; 62: 1573-7.
 49. Ruggieri M, Huson SM. The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology* 2001; 56: 1433-43.
 50. Boyd K, Korf B, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61 (1): 1-16.
 51. De Raedt T, Maertens O, Serra E, Legius E. Somatic *NF1* mutations in tumors and other tissue. In: *Neurofibromatoses*. Edited by D Kaufmann. Basel, Karger, 2008, pp 143-53.
 52. Whitehouse D. Diagnostic value of the café-au-lait spot in children. *Arch Dis Child* 1966; 41: 316-9.
 53. McKeever K, Sheperd CW, Crawford H, Morrison PJ. An epidemiological, clinical and genetic survey of Neurofibromatosis type 1 in children under sixteen years of age. *Ulster Med J* 2008; 77 (3): 160-3.
 54. Messiaen L, Wimmer K. *NF1* mutational spectrum. In: *Neurofibromatoses*. Edited by D Kaufmann. Basel, Karger, 2008. p 63-77.
 55. Messiaen L, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandebroucke I, Van Roy N, et al. Exhaustive mutation analysis of the *NF1* gene allows identification of 95%

- of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 2000; 15: 541-55.
56. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Saharapova T, Masciangelo C, et al. Preimplantation diagnosis for neurofibromatosis. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 218-22.
 57. Huson SM. The neurofibromatosis: classification, clinical features and genetic counselling. In: *Neurofibromatoses*. Edited by D Kaufmann. Basel, Karger, 2008. p. 1-20.
 58. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniuchi K, Kato R, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 2007; 39: 1120-6.
 59. Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, et al. Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome. *JAMA* 2009; 302: 2111-8.
 60. De Luca A, Schirinzì A, Buccino A, Bottillo I, Sinibaldi L, Torrente I, et al. Novel and Recurrent Mutations in the NF1 Gene in Italian Patients with Neurofibromatosis Type 1. Human mutation. *Mutation in Brief #716* (2004) Online. DOI:10.1002/humu.9245.
 61. Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. Online mutation report. *J Med Genet* 2003; 40: e82.
 62. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1(NF1). Review article. *J Med Genet* 1996; 33: 2-17.
 63. Korf BR. The NF1 genetic analysis consortium. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publishers, Oxford; 1998. p. 57-63.
 64. Trovó AB, Goloni-Bertollo EM, Mancini UM, Rahal P, De Azevedo Jr. WF, Tajara EH. Mutational analysis of the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene in Brazilian NF1 patients. *Genetics and Molecular Biology* 2004; 27 (3): 326-30.
 65. De Luca A, Buccino A, Gianni D, Mangino M, Giustini S, Richetta A, et al. NF1 gene analysis based on DHPLC. *Hum Mutat* 2003; 21: 171-2 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/40/6/e82>).
 66. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, et al. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation dependent probe amplification. *J Med Genet* 2007; 44: 800-8.
 67. Orraca Castillo M, Lantigua Cruz A, Licourt Otero D. Cariotipo de alta resolución en sangre periférica en la Neurofibromatosis I. *Sociedades científicas*. 2009_
 68. Novo Villaverde FJ. Diagnóstico de enfermedades genéticas. En: Martín-Romo M, Caicoya M, Editores, *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*. Madrid, España. Pearson Educación, S.A.; 2007. p. 228-31.
 69. Weihong Xu, Xiao Yang, Xiaoxia Hu, Shibo Li. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. *International journal of molecular medicine* 2014; 34: 53-60.
 70. Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, et al. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum Mutat* 2004; 23: 111-6.