

## Estudio clínico y molecular en pacientes cubanos con neurofibromatosis tipo I

Clinical and molecular study in cuban patients with type I neurofibromatosis

Yulia Clark Feoktistova<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4970-0249>

Aracelis Martínez Rubio<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9116-5342>

Yadira Hernández Pérez<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0662-3412>

Liudmila Feoktistova<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7966-1279>

Miladys Orraca Castillo<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7625-6078>

Estela Morales Peralta<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2663-4138>

<sup>1</sup>Universidad de Guantánamo. Guantánamo, Cuba.

<sup>2</sup>Centro Provincial de Genética Médica. Guantánamo, Cuba.

<sup>3</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Ministerio Salud Pública. La Habana, Cuba.

<sup>5</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Hospital Clínico-Quirúrgico “10 de Octubre”. La Habana, Cuba.

\* Autor para la correspondencia: [yclarkf@gmail.com](mailto:yclarkf@gmail.com)

### RESUMEN

**Introducción:** La neurofibromatosis tipo I es una enfermedad hereditaria, autosómica dominante, multisistémica, progresiva con penetrancia completa y expresividad variable. El análisis de las familias con marcadores moleculares permite realizar el diagnóstico por métodos indirectos.

**Objetivos:** Estudiar dos familias cubanas con al menos un caso de neurofibromatosis tipo I e identificar los alelos resultantes del polimorfismo para el diagnóstico molecular.

**Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo a dos familias con al menos un caso de neurofibromatosis tipo I. Se extrajo el ADN con la técnica de precipitación salina y fue utilizada la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento de interés. Se realizó la digestión enzimática con la enzima RsaI para analizar los alelos del polimorfismo estudiado y posteriormente hacer la electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

**Resultados:** Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las manchas color café con leche, pecas axilares e inguinales y lesiones óseas. Se detectaron los alelos 1 y 2 al analizar el polimorfismo en las muestras. Las frecuencias alélicas fueron 38,5 % y 61,5 % respectivamente.

**Conclusiones:** Fueron identificadas las principales manifestaciones clínicas en los pacientes. La técnica para el análisis del polimorfismo permitió el estudio molecular en las familias con neurofibromatosis tipo I. Se detectaron los alelos del marcador molecular y sus frecuencias. Se realizó el diagnóstico molecular de los individuos sospechosos.

**Palabras claves:** neurofibromatosis tipo I; fenotipo; genotipo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Neurofibromatosis type I is a hereditary, autosomal dominant, multisystemic, progressive disease with complete penetrance and variable manifestation. The analysis of families with molecular markers allows diagnosis by indirect methods.

**Objectives:** To study two Cuban families with at least one case of neurofibromatosis type I and to identify the alleles resulting from the polymorphism for molecular diagnosis.

**Methods:** A descriptive study of two families with at least one case of neurofibromatosis type I was performed. DNA was extracted with the saline precipitation technique and polymerase chain reaction was used for amplification of the fragment of interest. Enzymatic digestion was performed with the RsaI enzyme to analyze the alleles of the polymorphism studied and then to perform electrophoresis in 2% agarose gel.

**Results:** The most frequent clinical manifestations were café-au-lait spots, axillary and inguinal freckles and bone lesions. Alleles 1 and 2 were detected when analyzing the polymorphism in the samples. The allele frequencies were 38.5 % and 61.5 % respectively.

**Conclusions:** The main clinical manifestations in patients were identified. The technique for polymorphism analysis allowed the molecular study in the families with

neurofibromatosis type I. The alleles of the molecular marker and their frequencies were detected. Molecular diagnosis of suspected individuals was performed.

**Keywords:** neurofibromatosis type I; phenotype; genotype.

Recibido: 01/04/2022

Aceptado: 16/09/2022

## Introducción

La neurofibromatosis tipo I (NF1; MIM 162 200) se debe a las mutaciones en el gen NF1 y se incluye dentro de los síndromes neurocutáneos porque se asocian alteraciones neurológicas y cutáneas. Se considera multisistémica, con un patrón de herencia autosómico dominante, y se caracteriza por las manchas café con leche, efélides axilares e inguinales, nódulos de *Lisch* en el iris, neurofibromas cutáneos y un mayor riesgo de desarrollo de tumores. Presenta gran variabilidad clínica, incluso dentro de la misma familia, y la morbimortalidad está asociada a sus complicaciones multisistémicas que se incrementan con la edad.<sup>(1,2)</sup>

El diagnóstico clínico de los pacientes con NF1 se basa en los criterios establecidos por la conferencia para el desarrollo de consensos del Instituto Nacional de Salud.<sup>(3,4,5,6,7)</sup>

El gen NF1 se localiza en el cromosoma 17q11.27-9, contiene 60 exones que codifican para la proteína neurofibromina que es un supresor tumoral e inhibe al protooncogén RAS. Se expresa en las neuronas, en los oligodendrocitos y las células de *Schwann*. Aunque presenta un marcado componente hereditario, el 50 % de las mutaciones son nuevas, lo cual dificulta el diagnóstico molecular.<sup>(7)</sup>

Se han informado más de 1 000 mutaciones (HGMD-*Human Gene Mutation Database*); pero determinarlas resulta complejo por la heterogeneidad mutacional, la presencia de numerosos exones codificantes, el tamaño del gen y la ausencia de “puntos calientes”. Diversas son las técnicas utilizadas en los estudios moleculares por métodos directos, pero los costos son muy elevados.<sup>(8,9,10,11,12,13,14)</sup>

En el diagnóstico de la NF1 se utilizan varios marcadores a nivel mundial, entre ellos, los microsátelites y el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).<sup>(14)</sup> Una alternativa para realizar el diagnóstico molecular en Cuba de la NF1 es el uso de marcadores moleculares por métodos indirectos. Esta técnica permitió estudiar dos familias cubanas con al menos un caso de neurofibromatosis tipo I e identificar los alelos resultantes del polimorfismo para el diagnóstico molecular.

## Métodos

Se realizó un estudio descriptivo en el Centro Nacional de Genética Médica. Incluyó 14 individuos (mujeres y hombres) de dos familias con casos de NF1. Los pacientes asistieron a las consultas multidisciplinarias y dieron su conformidad para participar en la investigación, de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Se contó con la aprobación del Consejo Científico y el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

Las manifestaciones clínicas se evaluaron por un equipo multidisciplinario de dermatólogos, genetistas, neurólogos, psiquiatras, ortopédicos y oftalmólogos. Se siguieron los criterios establecidos para el diagnóstico de la enfermedad.

Las variables analizadas fueron las variantes del polimorfismo RFLP RsaI, alelo 1/1, alelo 1/2 y alelo 2/2. Se seleccionó el exón 5 del gen NF1 para la detección de las variantes del polimorfismo RFLP RsaI.<sup>(15)</sup> A los pacientes se les tomó la muestra de sangre y se extrajo el ADN mediante el método de precipitación salina<sup>(16)</sup> a partir de 10 ml de sangre periférica con 56 mg/mL de ácido etildiaminotetraacético(EDTA). Las condiciones para la amplificación del exón 5 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes: 100 ng de ADN, (F) 5'-TGACTTGAGTGATAGTTTCACAT-3' y (R) 5'-AAAAAAAAATCAATCGTATCCTTA-3', 1 mM de dNTPs (*Boehringer*), 10X tampón PCR, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 U de Taq polimerasa (*Invitrogen*), en un volumen de 25 µL. Se realizó la digestión enzimática con la enzima RsaI por 3 horas a 37°C.

El polimorfismo RFLP RsaI se determinó por comparación de las corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2 %. Se utilizaron controles positivos heterocigóticos y homocigóticos

del polimorfismo RsaI con el producto amplificado de la técnica de PCR del exón 5 del gen NF1.

Se calculó la media y desviación estándar de la edad de los pacientes en años. Se determinó la frecuencia del polimorfismo RFLP RsaI como número de alelos que presenta el polimorfismo RsaI/número de alelos totales. Se expresó en por ciento.

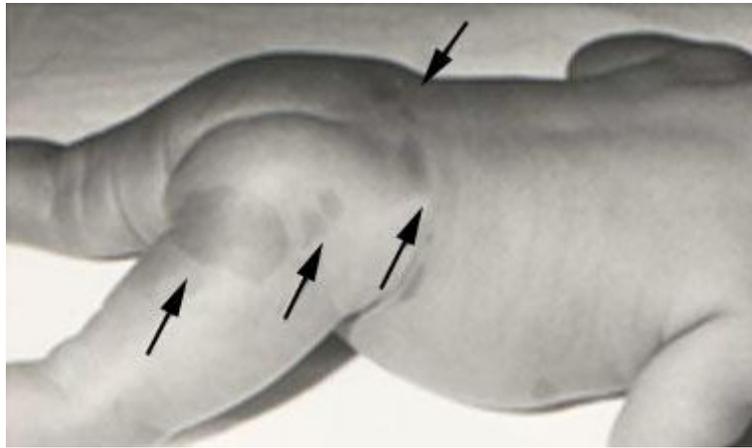
## Resultados

En los pacientes con el polimorfismo RFLP RsaI, la edad media fue de 30,2 años con desviación estándar de 17,2 años. El intervalo fue de 5 a 60 años (tabla 1).

**Tabla 1-** Criterios clínicos diagnósticos en los pacientes cubanos con NF1

F	I	Edad (años)	Sexo	MCCL	PA/PI	N	NL	Familiar afectado	LO	M	DA	RL	THDA
1	I.1*	51	M	x	x	x		x	x				
	I.2	48	F										
	II.1	21	F										
	II.2*	26	F	x	x			x	x	x			
	II.3	28	M										
	III.1†	5	M	x				x	x			x	
	III.2*	10	F	x	x			x	x				x
	III.3†	3	M	x				x					
2	I.1*	60	F	x	x	x	x						
	II.1	42	M										
	II.2	40	F	x			x			x			
	II.3	45	M										
	III.1*	18	M	x	x			x			x		
	III.2†	7	M	x				x			x		x
	III.3	10	F										
		27,6±18,9	7F, 8M	64 %	35,7 %	14 %	14 %	43 %	28,6 %	14 %	14 %	7 %	14 %

F: familias, I: Individuos, \*: pacientes, †: sospechoso, MCCL: manchas color café con leche, PA: pecas axilares, PI: pecas inguinales, N: neurofibromas, NL: nódulos de *Lish*, LO: lesiones óseas, M: macrocráneo, DA: dificultad aprendizaje, RL: retraso en el lenguaje, THDA: trastorno de hiperactividad con déficit de atención.



**Fig. 1-** Paciente con manchas color café con leche.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las manchas color café con leche, las pecas axilares e inguinales y las lesiones óseas. Las manifestaciones menos asiduas fueron los nódulos de *Lisch*, el macrocráneo y el retraso en el lenguaje (tabla 2).

**Tabla 2-** Frecuencia de los criterios clínicos diagnósticos en los pacientes estudiados

Criterios clínicos diagnóstico	P	F (%)	S	F (%)
MCCL	5	100	3	100
Pecas axilares/inguinales	4	80	-	
Neurofibromas	2	40	-	
Nódulos de Lisch	2	40	-	
Familiar de primer grado	5	100	3	100
Lesiones óseas	3	60	1	33
Macrocráneo	2	40		
Dificultad en el aprendizaje	1	20	1	33
Retraso en el lenguaje	-		1	33
Trastorno de hiperactividad con déficit de atención	1	20	1	33

P: Pacientes, S: Sospechoso, F: frecuencia.

El estudio molecular constituye una herramienta para confirmar casos dudosos de NF1. Se realizó el diagnóstico molecular por métodos indirectos y se utilizó un marcador, el RFLP RsaI, que se encuentra en el exón 5 del gen NF1. A continuación se muestran los resultados de la corrida electroforética de la digestión enzimática de este marcador (tabla 3).

**Tabla 3-** Alelos del polimorfismo RFLP RsaI en las familias analizadas

Familias	Individuos	Alelos RFLP RsaI
1	I.1*	1/1
	I.2	1/2
	II.1	1/2
	II.2*	1/1
	II.3	2/2
	III.1	1/2
	III.2*	1/2
2	I.1*	1/2
	II.1	1/2
	II.2	1/2
	II.3	2/2
	III.1*	1/2
	III.2	2/2
	III.3	2/2

\*: Paciente con diagnóstico clínico confirmado de NF1. III.1 y III.2 individuos en edad pediátrica con diagnóstico clínico dudoso.

Se estudiaron con marcador RFLP RsaI, presente en el exón 5, dos familias que tenían al menos un familiar con diagnóstico clínico certero de NF1. Se detectaron cinco casos (57,1 %) con la variante 1/2; dos (14,3 %) con genotipo 1/1 y dos (28,6 %) con la variante 2/2. Se identificaron los alelos 1 y 2 del polimorfismo RFLP RsaI en las muestras estudiadas. Las frecuencias alélicas fueron 38,5 % y 61,5 % respectivamente. Las dos familias resultaron informativas y se visualizó la herencia de padre a hijo. El estudio de este marcador se introdujo en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica.

## Discusión

Los criterios clínicos diagnósticos para la NF1 son bastante específicos en adultos; sin embargo, en niños menores de 8 años no es así. En ocasiones el diagnóstico clínico en edad pediátrica resulta dudoso.<sup>(17)</sup>

Las manchas color café con leche constituyen el hallazgo clínico más frecuente y precoz en los pacientes con NF1. Pueden ser congénitas o aparecer a lo largo del primer año de vida (99 %) y aumentar con la edad.<sup>(9,10,14)</sup> En esta investigación el 100 % de los casos las

presentaban, similar a lo informado en otras poblaciones.<sup>(3,17)</sup> Las pecas axilares e inguinales fueron otra de las manifestaciones más frecuentes.

Las lesiones óseas y los neurofibromas estuvieron representados en el 28,6 % de los participantes. La dificultad en el aprendizaje y el trastorno de hiperactividad con déficit de atención tuvo un 14 % de frecuencia. El retraso del lenguaje fue observado en un solo paciente. En la edad pediátrica las manifestaciones no son tan visibles y esto coincide con la literatura consultada.<sup>(3,9,10,14,18)</sup>

Los genes modificadores es una de las posibles causas de la variedad de las sintomatologías en los pacientes con NF1. Diferentes investigaciones han propuesto como genes modificadores el SDC2, VCP, PTEN, ANRIL, p53, ATF4, BDNF, entre otros.<sup>(19,20,21,22)</sup>

El estudio molecular por métodos indirectos es una alternativa para el diagnóstico de NF1 en países en vías de desarrollo. Como requisito se estudian las familias con al menos un caso de la enfermedad. La limitación de este estudio radica en tener una muestra pequeña, sin embargo, sirve como punto de partida a otras investigaciones de mayor escala. Se deben trabajar otros marcadores moleculares como los microsatélites para adquirir más información de las familias que se estudien. En el laboratorio del Centro Nacional de Genética Médica se trabaja en la introducción de los siguientes marcadores IVS27AC28.4, IVS27AC33.1 e IVS38GT53.0. Próximamente se brindará diagnóstico pre y posnatal de la NF1 en Cuba.

Este es el primer estudio molecular por métodos indirectos en Cuba. Se realizó el diagnóstico clínico de pacientes cubanos con NF1. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las manchas color café con leche y las pecas axilares/inguinales. Se identificaron los alelos del polimorfismo RFLP R<sub>SAI</sub>, la variante más frecuente fue el 1/2. El estudio del marcador RFLP R<sub>SAI</sub> permitirá realizar el diagnóstico molecular por métodos indirectos en los pacientes cubanos con NF1.

### Agradecimientos

A los pacientes por participar en esta investigación. Al Ministerio de Salud Pública y al Centro Nacional de Genética Médica. A la Dr. C. Teresa Collazo Mesa.

## Referencias bibliográficas

1. Kallionpaa R, Uusitalo E, Leppavirta J, Poyhonen M, Peltonen S, Peltonen J. Prevalence of neurofibromatosis type 1 in the Finnish population. *Genet Med*. 2018;20(9): 1082-6. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2017.215>
2. Orraca M, Morejón G, Cabrera N, Menéndez R, Orraca O. Neurofibromatosis 1 prevalence in children Aged 9-11 years, Pinar del Río province, Cuba. *Medicc Rev*. 2014 [acceso 07/01/21];16(3-4):22-6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=64159>
3. Legius E, Messiaen L, Wolkenstein P, Pancza P, Avery R, Berman Y, *et al*. Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation. *Genet Med*. 2021;23:1506-13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01170-5>
4. Suerink M, Ripperger T, Messiaen L, Menko F, Bourdeaut F, Colas C. Constitutional mismatch repair deficiency as a differential diagnosis of neurofibromatosis type 1: consensus guidelines for testing a child without malignancy. *J Med Genet*. 2019 [acceso 10/01/21];56(2): 53-62. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02331880/document>
5. Gutmann D, Ferner R, Listernick R, Korf B, Wolters P, Johnson K. neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.4>
6. Buchholzer S, Verdeja R, Lombardi T. Type I Neurofibromatosis: case report and review of the literature focused on oral and cutaneous lesions. *Dermatopathol*. 2021;8(1):17-24. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fdermatopathology8010003>
7. Tamura R. Current understanding of neurofibromatosis type 1, 2 and Schwannomatosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5850. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115850>
8. Koczkowska M, Callens T, Chen Y, Gomes A, Hicks A, Sharp A, *et al*. Clinical spectrum of individuals with pathogenic NF1 missense variants affecting p.Met1149, p.Arg1276, and p.Lys1423: genotype–phenotype study in neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat*. 2020;41(1):299-315. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.23929>
9. Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S, *et al*. Genotype-phenotype correlation in NF1: evidence for a more severe phenotype associated with

- missense mutations affecting NF1 codons 844-848. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):69-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.12.001>
10. Gómez M, Botero J, Tierradentro L, Vélez A. Neurofibromatosis tipo 1: relación genotipo-fenotipo. *Act Neurol Colomb.* 2020;36(2):93-99. DOI: <https://doi.org/10.22379/24224022284>
11. Bin M, Siyu Ch, Xin Ch, Xiumei Y, Xiaojia Z, Tao Y, *et al.* Clinical characteristics and spectrum of NF1 mutations in 12 unrelated Chinese families with neurofibromatosis type 1. *BMC Med Genet.* 2018;19:101. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0615-8>
12. Kirat E, Mutlu H. The Spectrum of NF1 Gene Variations in Southeastern Turkey. *J Pediatr Res.* 2021 [acceso 17/01/21];8(3):286-96. Disponible en: <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA675524943&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=21479445&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E2d9eafa8>
13. Pacot L, Vidaud D, Sabbagh A, Laurendeau I, Briand-Suleau A, Coustier A, *et al.* Severe phenotype in patients with large deletions of NF1. *Cancer.* 2021;13(12):2963. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13122963>
14. Wei W, Cheng-Jiang W, Xi-Wei C, Yue-Hua L, Yi-Hui G, Bin G, *et al.* Impacts of NF1 gene mutations and genetic modifiers in neurofibromatosis type 1. *Neurol.* 2021;12:704639. DOI: <https://doi.org/10.3389%2Ffneur.2021.704639>
15. Fang L, Chalhoub N, Li W, Feingold J, Ortenberg J, Lemieux B, *et al.* Genotype analysis of the NF1 gene in the french canadians from the Quebec population. *Am J of Med Genet.* 2001;104(3):189-98. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.10034>
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215. DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F16.3.1215>
17. Vaucheret E, López A, Puga C, García M, Baliarda F, Ekonen C, *et al.* Cognitive profile and disorders affecting higher brain functions in paediatric patients with neurofibromatosis type 1. *Neurol.* 2017;17(30):148-2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.02.010>
- 18- Nishida Y, Ikuta K, Natsume A, Ishihara N, Morikawa M, Kidokoro H, *et al.* Establishment of in-hospital clinical network for patients with neurofibromatosis type 1 in

Nagoya University Hospital. Nature. 2021;11:11933. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91345-6>

19. Woycinck T, Brussa L, Finger T, Ashton-Prolla P, Rosset C. Systems biology approaches reveal potential phenotype-modifier genes in neurofibromatosis type 1. Cancer. 2020;12(9):2416. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12092416>

20. Wei W, Wei ChJ, Cui XW, Li YH, Gu YH, Gu B, *et al.* Impacts of NF1 gene mutations and genetic modifiers in neurofibromatosis type 1. Neurol. 2021;12:704639. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.704639>

21. Korfhage J, Lombard DB. Malignant peripheral nerve sheath tumors: from epigenome to bedside. Mol Cancer Res. 2019;17(7):1417-28. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0147>

22. de Paula J, Costa D, Alvim-Soares A, Araújo P, Rodrigues L, Malloy-Diniz L, *et al.* Association between a functional polymorphism of the BDNF gene and visuospatial memory in a sample of neurofibromatosis type 1. Psychol Neurosci. 2021;14(4):379-387. DOI: <https://psycnet.apa.org/doi/10.1037/pne0000256>

### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Conceptualización, investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Yulia Clark Feoktistova.

*Conceptualización, investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Aracelis Martínez Rubio.

*Conceptualización, investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Liudmila Feoktistova.

*Conceptualización, investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Miladys Orraca,

*Conceptualización, investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Estela Morales Peralta.

*Investigación, redacción-borrador original, redacción revisión y edición:* Yadira Hernández Pérez.