



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Graduação em Biotecnologia  
Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO DE GRANDES REARRANJOS EM PACIENTES COM  
NEUROFIBROMATOSE TIPO 1 DO SUL DO BRASIL**

**Aluno(a): Maievi Fonini / 00191664**

Serviço de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
(HCPA)

Término: Dezembro de 2015

Orientador(a): Patricia Ashton-Prolla

Co-orientador(a): Clévia Rosset

Colaborador(a): Andreia Carina Turchetto Zolet

Departamento de Genética/ UFRGS, Laboratório de Medicina Genômica,  
Serviço de Genética Médica e Serviço de Pesquisa Experimental do HCPA

Porto Alegre, dezembro de 2015.

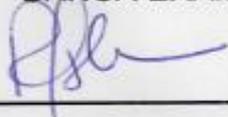
MAIEVI FONINI

**CARACTERIZAÇÃO DE GRANDES REARRANJOS EM PACIENTES COM  
NEUROFIBROMATOSE TIPO 1 DO SUL DO BRASIL**

Esta monografia foi julgada e aprovada junto ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Porto Alegre, 11 de DEZEMBRO de 2015.

BANCA EXAMINADORA

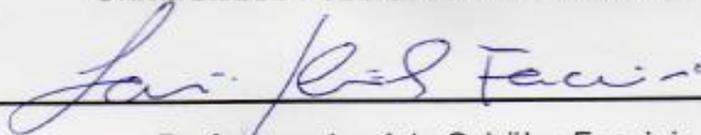


(ORIENTADORA)

---

Professora Patricia Ashton-Prolla

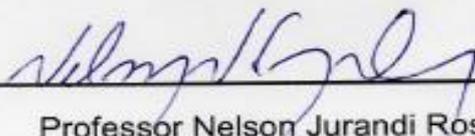
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



---

Professora Lavinia Schüler-Faccini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul



---

Professor Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço,

Aos meus pais, por sempre me instigarem a aprender e terem tanta paciência com toda a minha hiperatividade.

Às quatro mulheres que me orientaram tão bem durante este trabalho, Patricia Ashton-Prolla, Andreia Carina Turchetto Zolet, Cristina Netto e Clévia Rosset.

Ao meu namorado, por relevar todo o meu mau humor durante os estudos intermináveis para provas e para escrever este trabalho, e também, por me apoiar na maioria das minhas decisões.

Aos meus amigos Clévia, Daniela, Débora, Igor, Ivaine, Jamile, Letícia, Mario, Michele e Thais por todas as conversas e situações divertidas e/ou dramáticas que compartilhamos.

Ao meu cusco, Café, por toda a fidelidade, alegria, paciência, aflição e bagunça que nós compartilhamos.

## RESUMO

A neurofibromatose tipo 1 é uma desordem hereditária autossômica dominante, de alta penetrância, causada por diversas alterações moleculares que acarretam em perda de função do gene *NF1*. A proteína codificada por esse gene possui um domínio de GTPase que regula negativamente a atividade da proteína RAS, sendo que a perda funcional de *NF1* resulta no aumento da proliferação celular e no conseqüente aumento da chance de desenvolvimento de tumores. Os grandes rearranjos de *NF1*, dos mais diferentes tipos, estão presentes em 5-10% dos pacientes e normalmente estão relacionados com um quadro clínico mais grave. Neste estudo, além da descrição de casos de pacientes portadores de grandes rearranjos diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, também foi estudada a possibilidade de implementação de outros genes relacionados com o fenótipo da doença no diagnóstico molecular de *NF1*. Para isso, foram pesquisadas evidências que indiquem a importância dos genes deletados nos grandes rearranjos, através de revisão bibliográfica e de análises *in silico*, que também facilitam a escolha de genes alvo para estudos posteriores. Foi demonstrado que além de *NF1*, seria interessante avaliar as alterações adicionais nos genes *RNF135* e *SUZ12* nas análises moleculares dos casos clínicos de neurofibromatose tipo 1, visto que alterações nesses genes parecem modificar o fenótipo da doença. Os genes *RNF135*, *SUZ12*, *OMG*, *ADAP2*, *ADAP1*, *RAB11FIP4* e *RAB11FIP3*, a maioria adjacente ao gene *NF1*, são fortes candidatos a serem modificadores de fenótipo e podem fazer parte de estudos posteriores.

## ABSTRACT

Neurofibromatosis type 1 is an autosomal dominant inherited disorder, with high penetrance, caused by different molecular changes that lead to loss of function of the *NF1* gene. The protein encoded by this gene has a GTPase domain that negatively regulates RAS protein activity, and the functional loss of NF1 results in an increased cell proliferation and consequently in an increased chance of tumor development. The different types of *NF1* large rearrangements are present in 5-10% of patients and are usually related to a more severe clinical condition. In this study, NF1 patients diagnosed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were screened for large rearrangements and clinically characterized; the possibility of the incorporation of other genes related to disease phenotype in NF1 molecular diagnosis was also studied. For this purpose, was researched evidence indicating the importance of the deleted genes in large rearrangements have been searched through literature review and *in silico* analysis, in order to facilitate the choice of target genes for further study. It was demonstrated that besides *NF1* gene, it would be interesting to evaluate additional changes in *SUZ12* and *RNF135* genes in the molecular analysis of clinical cases of neurofibromatosis type 1, since changes in these genes seem to modify the disease phenotype. The *RNF135*, *SUZ12*, *ADAP2*, *OMG*, *ADAP1*, *RAB11FIP4* and *RAB11FIP3* genes, most of them localized adjacent to the *NF1* gene, are strong candidates to be phenotype modifiers and can take part in subsequent studies.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Neurofibromatose tipo 1 .....	1
1.1.1 <i>Sintomatologia e Diagnóstico da Neurofibromatose tipo 1</i> .....	1
1.1.2 <i>O gene NF1 e a proteína neurofibromina</i> .....	3
1.1.3 <i>Mutações em NF1</i> .....	4
1.1.4 <i>Microdeleções</i> .....	5
1.1.5 <i>Correlações genótipo-fenótipo</i> .....	6
1.2 A importância das análises <i>in silico</i> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
2.1 Objetivo geral .....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
4.1 Recrutamento dos Pacientes .....	12
4.2 Pesquisa de rearranjos gênicos .....	12
4.2.1 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)</i> .....	13
4.3 Correlações genótipo-fenótipo .....	14
4.4 Análises <i>in silico</i> .....	14
4.4.1 <i>Escolha dos organismos</i> .....	14
4.4.2 <i>Análises filogenéticas e de estrutura éxon-ínton</i> .....	14
<b>5 RESULTADOS</b> .....	15
5.1 Análises moleculares e descrição clínica .....	15
5.2 Análises <i>in silico</i> .....	17
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	21
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	22
<b>8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b> .....	23
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

Genodermatose é uma denominação genérica atribuída a um grande grupo de desordens hereditárias, que apresentam manifestações cutâneas. Essas desordens são classificadas em distúrbios de queratinização (ictiose, hiperqueratose palmo-plantar, epidermólise bolhosa), desordens relacionadas com a produção de colágeno (síndrome de Ehlers-Danlos, pseudoxantoma elástico) e síndromes com propensão a desenvolver câncer (neurofibromatoses e esclerose tuberosa) (Burrows, 2009). O reconhecimento das alterações na pele de pessoas afetadas é importante não apenas para a iniciação da terapia dermatológica apropriada, mas também para a detecção de outras anormalidades associadas, frequentemente multissistêmicas, incluindo a malignidade.

As neurofibromatoses são distúrbios autossômicos dominantes hereditários, que afetam, primariamente, o crescimento de células de tecidos neurais e predispõem à formação de tumores principalmente benignos. A neurofibromatose tipo 1 ou NF1 (tipo mais comum), também conhecida como doença de Von Recklinghausen, afeta cerca de 1 em 3.000 indivíduos e é caracterizada por neurofibromas cutâneos benignos e neurofibromas plexiformes, além de anormalidades pigmentares como manchas café-com-leite na pele, nódulos de Lisch na íris e efélides axilares e inguinais. Dificuldades de aprendizado e problemas ortopédicos ocorrem em até 50% dos pacientes (Ferner, 2010).

### 1.1 Neurofibromatose tipo 1

#### 1.1.1 *Sintomatologia e Diagnóstico da Neurofibromatose tipo 1*

Essa condição está frequentemente relacionada com mutações de perda de função no gene neurofibromina 1 (*NF1*), e apesar desse distúrbio ser autossômico dominante e possuir penetrância completa, o fenótipo é muito variável, até mesmo em membros da mesma família. Essa variabilidade é difícil

de explicar e pode ocorrer até mesmo em gêmeos que herdam o mesmo alelo causador da doença (Vogt *et al.*, 2011).

Pacientes com NF1 possuem um maior risco de desenvolver tumores benignos e malignos. Complicações malignas são menos frequentes, porém são as manifestações mais sérias da doença. Em geral, os pacientes com NF1 tem um risco 2,7 vezes maior de desenvolver câncer, com um risco cumulativo de 20% em pacientes com mais de 50 anos de idade (Friedman e Birch, 1997). A incidência de malignidade varia entre 4% e 52% em pacientes com NF1 (Walker *et al.*, 2006) e geralmente leva a morte prematura do indivíduo.

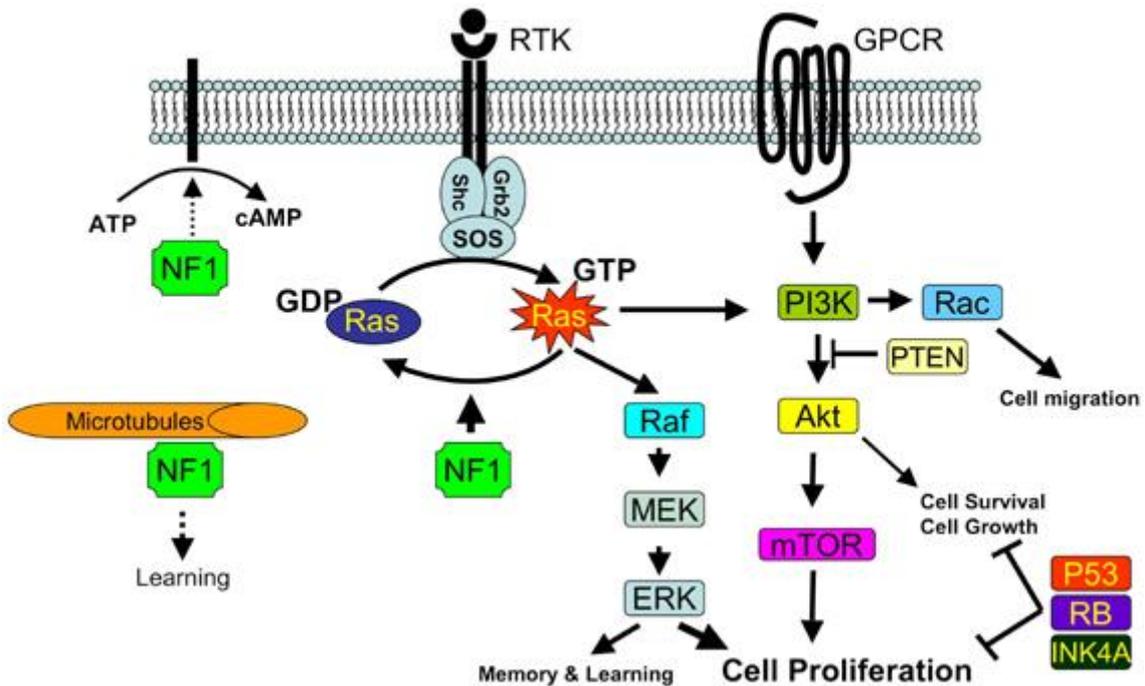
Para que as complicações malignas apareçam, é necessária a inativação dos dois alelos do *NF1*, levando à inativação funcional total da proteína codificada pelo mesmo. Um mecanismo de dois eventos, indicativo de gene supressor tumoral, tem sido demonstrado em tumores malignos de pacientes com NF1. Há múltiplos mecanismos possíveis para a inativação somática do segundo alelo de *NF1*, incluindo perda de heterozigosidade, mutação e metilação do promotor. É possível que outros mecanismos ocorram, como o silenciamento epigenético mediado por micro-RNAs (Garcia-Linares *et al.*, 2010).

Os critérios para o diagnóstico clínico de NF1, foram estabelecidos em 1987 pela *National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference* (EUA) e são aplicados desde 1997. Segundo estes critérios, o diagnóstico definitivo de NF1 pode ser realizado em uma criança de quatro anos de idade, se dois ou mais dos critérios descritos estiverem presentes (Anexo 1), já que aproximadamente 85% dos pacientes apresentam manifestações clínicas típicas da doença até esta idade. As crianças que herdam NF1 de um dos pais afetado geralmente podem ser diagnosticadas no primeiro ano de vida, principalmente pelas múltiplas manchas café-com-leite, que se desenvolvem na infância em mais de 95% desses casos (Nunley *et al.*, 2009).

Quando o diagnóstico clínico não é possível (ausência de critérios típicos, presença de fenótipo atípico) e para finalidades de aconselhamento genético, o teste molecular é a estratégia mais importante para definição diagnóstica. O teste genético também tem grande utilidade nos casos em que não há história familiar e nos casos em que se observa mais de um fenótipo de síndrome genética de predisposição ao câncer na família (por exemplo, fenótipo de NF1 em pelo menos uma pessoa da família e história familiar importante de câncer de mama).

### 1.1.2 O gene *NF1* e a proteína neurofibromina

A *NF1* é causada por diversas mutações de perda de função em *NF1* (Ars *et al.*, 2003), um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17q11.2, com 58 éxons e 350kb, que codifica a proteína hidrofílica neurofibromina de 2818 aminoácidos e 250kDa. A neurofibromina é principalmente expressa em neurônios, células de Schwann, oligodendrócitos e leucócitos (Moles *et al.*, 2012). Ela é uma proteína citoplasmática, que não tem uma função completamente compreendida, mas parece controlar a via RAS (*rat sarcoma*), responsável pelo controle da proliferação celular e ativação de genes supressores tumorais (Barbacid *et al.*, 1987). Há uma região de 360 aminoácidos (compreendendo os éxons 21-27) que mostra homologia com o domínio catalítico da *GTPase activating protein (GAP)* de mamíferos e com os produtos dos genes *IRA1* e *IRA2* de leveduras (Xu *et al.*, 1990). A ligação do nucleotídeo guanina à proteína RAS medeia a transdução de sinais que regulam o crescimento celular. A ligação de GTP à RAS ativa a sinalização, enquanto a hidrólise para GDP catalisada por *GAP* cessa o sinal, inibindo o crescimento celular (Barbacid *et al.*, 1987). O domínio relacionado à *GAP* da neurofibromina também hidrolisa GTP (Figura 1), assim como possui propriedades consistentes com regulação negativa dos múltiplos efetores ativados por RAS, como *PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinase)* e *MAPK (mitogen-activated kinase)*, que estão envolvidos na proliferação celular, síntese de DNA e apoptose. A inativação do gene *NF1* resulta na ativação constitutiva desses sistemas, o que resulta no aumento da proliferação celular e, conseqüentemente, da chance de desenvolvimento de tumores.



**Figura 1:** Representação das interações de NF1 com as vias de RAS e PI3K. NF1 também pode se associar aos microtúbulos e modular a via de sinalização cAMP-PKA (Le e Parada, 2007).

### 1.1.3 Mutações em NF1

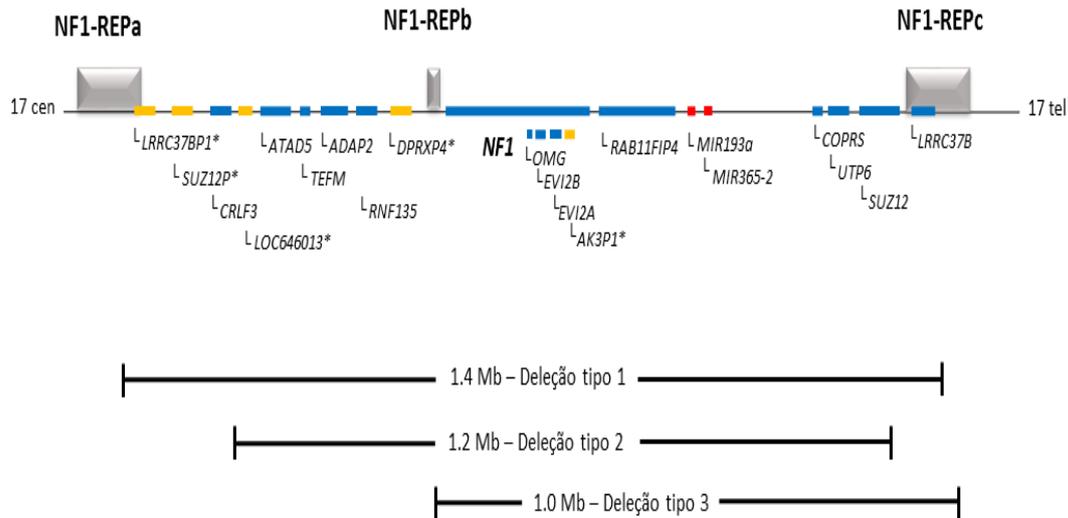
A neurofibromatose tipo 1 é um dos distúrbios hereditários autossômicos dominantes mais comuns em humanos, sendo caracterizada por anormalidades nos múltiplos tecidos derivados da crista neural. Entretanto, não há dados sobre a sua prevalência no Brasil. Nos casos de NF1 familiar, a mutação é herdada de um dos pais, mas em mais da metade dos pacientes mutações *de novo* são a causa de NF1 esporádica (Evans *et al.*, 2010).

Pelo menos 1347 mutações diferentes em *NF1* foram identificadas (*The Human Gene Mutation Database*, 2013), envolvendo deleções, duplicações, mutações em sítios de processamento, mutações de perda de sentido, mutações de sentido trocado, translocações e alterações da região 3' não-traduzida do gene. A maioria das mutações é única em uma família particular, sendo que mais de 80% das mutações germinativas descritas parecem resultar em uma proteína truncada, geralmente pela alteração do processamento de RNA mensageiro (Ars *et al.*, 2003). Grandes deleções, em diferentes regiões do braço q no cromossomo 17 e de tamanhos variados, estão presentes em 5-10% dos pacientes (Kluwe *et al.*, 2004).

#### 1.1.4 Microdeleções

Microdeleções são alterações observadas em aproximadamente 5% dos pacientes com NF1 (Clementi *et al.* 1996). As microdeleções mais frequentes (tipo 1, 2 e 3) são de aproximadamente 1.5 Mb, envolvendo a região inteira do gene *NF1* (López-Correa *et al.* 2000; Dorschner *et al.* 2000) além de outros 13 genes que flanqueiam o gene *NF1* (Figura 2), sendo que a maioria destes genes não possui função conhecida (De Raedt *et al.*, 2003). A microdeleção do tipo 1 abrange 1.4 Mb de comprimento, contendo 14 genes, 5 pseudogenes e 2 genes de microRNAs e é causada por recombinação homóloga não alélica entre sequências parálogas localizadas a montante (NF1-REPa) e a jusante (NF1-REPc) do gene *NF1* (Dorchner *et al.*, 2000; Jenne *et al.*, 2003). Essas sequências, também presentes na região NF1-REPb, são compostas por cópias do pseudogene LRRC37BP, pequenos fragmentos do pseudogene SMURF2 e por sequências parálogas derivadas do gene LPHN1, localizado no cromossomo 19 (Jenne *et al.* 2003). A microdeleção tipo 2 é menor (1.2 Mb) e tem seus pontos de quebra localizados no gene *SUZ12* e em seu pseudogene *SUZ12P* (Petek *et al.*, 2003 and Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2004). Por último, a microdeleção tipo 3, de 1.0 Mb de comprimento, apresenta os pontos de quebra dentro de repetições de pequenas cópias, denominadas NF1-REPb e NF1-REPc (Bengesser *et al.*, 2010).

Os pacientes com a microdeleção tendem a ter um fenótipo diferente, quando comparado com grupos que apresentam alterações de ponto em *NF1* (De Raedt *et al.*, 2003). Os indivíduos com NF1 que apresentam microdeleções, frequentemente têm mais neurofibromas em idade precoce, um QI médio menor, características faciais dismórficas (Kayes *et al.*, 1994 e Wu *et al.*, 1995), além de um risco elevado de desenvolver tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (do inglês *MPNSTs*) (De Raedt *et al.*, 2003). A análise de mutações no gene *NF1* tem sido considerada muito complexa pelo grande tamanho do gene, presença de pseudogenes de *NF1* e grande variedade de possíveis anormalidades. As estratégias de diagnóstico recomendam que a pesquisa de grandes deleções seja feita inicialmente, seguida da detecção de mutações de ponto em pacientes sem essas grandes alterações (Kluwe *et al.*, 2004).



**Figura 2:** Representação da região 17q11.2 onde comumente ocorrem as microdeleções em NF1. Em azul estão os genes, em laranja os pseudogenes e em vermelho os genes de microRNA. **Adaptado de H. Kehrer-Sawatzki e D.N. Cooper (Molecular Cellular Biology, capítulo 14, página 188).**

### 1.1.5 Correlações genótipo-fenótipo

Poucos estudos investigaram correlações genótipo-fenótipo em NF1 até o momento, e dados adicionais de casos de diferentes países são necessários para verificar a utilidade do teste genético na predição do fenótipo. Apenas três correlações genótipo-fenótipo claras têm sido observadas: a deleção de todo o gene *NF1* está associada com o aparecimento precoce e numeroso de neurofibromas cutâneos, anormalidades cognitivas mais frequentes e mais graves, mãos e pés grandes e dismorfia facial (Mautner *et al.*, 2010); a deleção de 3pb na extremidade do éxon 17 confere menor risco de desenvolvimento de neurofibromas cutâneos ou plexiformes (Upadhyaya *et al.*, 2007); indivíduos com todo o locus *NF1* duplicado não têm o fenótipo NF1, mas podem ter deficiência mental e convulsões (Grisart *et al.*, 2008).

As funções dos genes frequentemente deletados nas microdeleções podem facilitar o entendimento dos diferentes fenótipos entre os pacientes que apresentam esse tipo de grande rearranjo. As informações mais relevantes que foram encontradas sobre a funcionalidade desses genes, estão descritas na

tabela suplementar 1 (Anexo 2). A maioria dos genes está relacionada com o desenvolvimento de alguns órgãos ou com o controle do ciclo celular, porém os genes *RNF135*, *SUZ12*, *ADAP2*, *UTP6* e *OMG* merecem um foco maior quando se trata de relação genótipo-fenótipo.

A haploinsuficiência do gene *RNF135* parece estar relacionada com alta estatura, macrocefalia, bem como com dismorfias faciais em pacientes com a microdeleção, porém a primeira e a última característica podem se normalizar em direção à idade adulta, o que mostra a grande necessidade de um diagnóstico mais completo durante a infância (Spiegel et al., 2005, Douglas et al., 2007). A perda funcional de *SUZ12* foi mostrada como sendo um dos fatores, junto da perda funcional de *NF1*, para o desenvolvimento de tumores malignos da bainha do nervo periférico (Zhang et al., 2014). Ao mesmo tempo, essa perda funcional acaba ativando um interruptor epigenético que sensibiliza tumores ao tratamento de inibidores de bromodomínios, uma estratégia terapêutica promissora (De Raedt et al., 2014). Devido à elevada expressão de *SUZ12* e *ADAP2* nos tecidos cardíacos, esses genes são fortes candidatos a estarem relacionados com má formação cardiovascular (Venturin et al., 2004). O gene *OMG* parece estar envolvido com dificuldade de aprendizagem em pacientes com *NF1* (Terzi et al., 2011), além de regular o crescimento celular (Vourc'h et al., 2003). Já a haploinsuficiência de *UTP6* parece conferir às células de pacientes com a microdeleção uma menor suscetibilidade a apoptose, aumentando o risco de desenvolvimento de tumores (Pidubnyak et al., 2007).

Além dessas correlações, já foi demonstrado que, em uma comparação entre células de *MPNSTs*, neurofibromas cutâneos e neurofibromas plexiformes de pacientes com microdeleções, *OMG* e *SUZ12* tiveram aumento significativo de suas expressões em neurofibromas plexiformes quando comparados com os neurofibromas cutâneos, enquanto *ATAD5*, *EVI2A* e *COPRS* foram superexpressos e *ADAP2*, *RNF135* e *EVI2B* tiveram sua expressão menor em *MPNSTs* (Pasmant et al., 2011). Estes resultados sugerem a relação destes genes no desenvolvimento de tumores benignos e malignos.

Com base nestas correlações, a detecção de grandes rearranjos e de deleções no gene *NF1* é de grande importância em centros de saúde. Além disso, análises moleculares cada vez mais precisas têm fornecido um novo meio de confirmar o diagnóstico de *NF1* em cerca de 95% dos pacientes (Wimmer et al 2006, Messiaen & Wimmer 2008), principalmente por causa da sobreposição

clínica entre NF1 e outras Rasopatias (por exemplo, síndrome de Legius). Se uma mutação patogênica for identificada, o aconselhamento genético e testes genéticos de outros membros da família podem ser oferecidos (incluindo a análise pré-natal). A identificação de mutações em *NF1* é trabalhosa, e protocolos atuais são baseados em combinações de técnicas complementares. Recentemente, as técnicas Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) e array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) têm sido amplamente utilizadas para detectar grandes rearranjos gênicos associados com várias doenças. A técnica de MLPA é a mais amplamente utilizada, principalmente pelo seu custo reduzido e sua boa resolução quando comparado ao método *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), mas essa técnica precisa ser validada antes de ser utilizada por diferentes laboratórios.

É provável que a variabilidade clínica de NF1 resulte de uma combinação de fatores genéticos, ambientais e estocásticos. Tal complexidade e a diversidade de mutações que ocorrem nesta doença tornam difícil a correlação genótipo-fenótipo.

Não há cura para a Neurofibromatose tipo 1, sendo o tratamento focado na melhoria dos sintomas. A melhor compreensão genética dessas desordens, a definição de correlações genótipo-fenótipo e de genes alvo para futuros estudos envolvendo biologia molecular e bioquímica, bem como a caracterização *in silico* dos genes presentes na região gênica relacionada com a doença, poderão influenciar o manejo destes pacientes e familiares, incluindo aconselhamento genético e manejo terapêutico.

## **1.2 A importância das análises *in silico***

Historicamente, a maneira mais utilizada para investigar biomoléculas era centrada na caracterização de moléculas individuais para entender seu papel no desenvolvimento de um fenótipo. Entretanto, essa estratégia não é efetiva para elucidar a evolução de uma doença complexa (Murray *et al.*, 2007), tornando o progresso para o entendimento da mesma lento. Para acelerar esse processo, análises moleculares *in silico* têm sido cada vez mais utilizadas como método de rastreamento de alvos a serem estudados, ainda mais quando levamos em

consideração a crescente disponibilidade de dados genômicos, pois aumentam consideravelmente a qualidade do delineamento de um projeto científico.

A filogenia molecular e a análise comparativa da estrutura gênica são ferramentas interessantes para melhorar a compreensão das relações evolutivas e funcionais dos genes estudados (Wang *et al.*, 2012). Um exemplo disso é a inferência de que a conservação de uma sequência proteica está frequentemente relacionada a um papel funcional crítico dessa macromolécula na célula (Siepel *et al.*, 2005).

Os grandes primatas possuem um grau elevado de duplicons, sendo os centrais os mais abundantes e frequentemente relacionados com o surgimento de novos genes, com diferenças drásticas de expressão gênica e de variação estrutural (Jin *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2001). A presença de um duplicon central ao longo do braço q do cromossomo 17, acabou levando ao surgimento da família gênica LRRC37 durante a evolução dos primatas (Jin *et al.*, 2004). É esperado que informações interessantes possam ser encontradas com a investigação dessa região cromossômica, por meio de análises comparativas entre diferentes espécies de primatas.

É perceptível que poucos estudos sobre os genes deletados e suas relações com o fenótipo variável da doença foram feitos até o momento. É possível que este seja um dos motivos que explica a dificuldade encontrada para correlacionar genótipo e fenótipo nos pacientes com microdeleções. As análises *in silico* podem auxiliar na elucidação a respeito da importância desses genes em diferentes espécies, facilitando a escolha de genes alvos para estudos posteriores. Junto disso, o foco dessas análises na ordem dos primatas aumenta a robustez do estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar do ponto de vista clínico e avaliar a presença de grandes rearranjos em pacientes e familiares com diagnóstico de Neurofibromatose tipo 1 avaliados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, além de realizar uma caracterização *in silico* dos genes deletados.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a presença de grandes rearranjos no gene *NF1* em pacientes atendidos no Programa de Oncogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), de acordo com o fenótipo clínico, através da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*);
- b) Descrever os dados demográficos e história natural de pacientes com grandes rearranjos em *NF1* atendidos no Programa de Oncogenética do HCPA;
- c) Realizar análises *in silico* que auxiliem na compreensão do impacto das diferentes deleções encontradas nos pacientes com Neurofibromatose tipo 1, através de análises filogenéticas e de estruturas éxon-íntron em primatas;
- d) Tentar estabelecer correlações genótipo-fenótipo específicas para os pacientes com grandes rearranjos.

### 3 JUSTIFICATIVA

A Neurofibromatose tipo 1, com manifestações e gravidade que variam em cada paciente, torna o diagnóstico e o acompanhamento clínico dos pacientes afetados um desafio para as várias especialidades médicas envolvidas. Dessa forma, estudos clínicos e moleculares são extremamente relevantes para facilitar o manejo dos casos. Atualmente não há coleta sistemática de dados em nível nacional ou regional para entender as características clínicas e moleculares de indivíduos e famílias afetadas com NF1. Os grandes rearranjos são, na maioria das doenças e na maioria dos casos, relacionados à ocorrência de fenótipos mais graves, sendo que a ocorrência desses rearranjos é bem relevante nos pacientes com a doença em questão, ocorrendo na frequência de 5% a 10% desses pacientes. Como pouca informação é encontrada sobre os demais genes deletados nas microdeleções, estudos de caracterização *in silico* podem revelar informações relevantes sobre a importância funcional dos mesmos, facilitando a escolha de genes alvo para estudos posteriores. Assim, o conhecimento prévio da presença dessas alterações em pacientes pode contribuir para redução da mortalidade e morbidade associadas, sendo que a caracterização das mesmas também pode ajudar na identificação de grupos de pacientes de maior risco que se beneficiariam com programas de prevenção e detecção precoce de neoplasias. O espectro das diferentes deleções que ocorrem nesses pacientes ainda pode ser útil para a compreensão da função dos genes envolvidos, para o aconselhamento genético, para determinar se há diferença significativa na taxa de detecção entre casos familiares e esporádicos e se há correlações genótipo-fenótipo claras nessa população. Essas informações poderão também servir de subsídio para o desenvolvimento de novas estratégias de estudo em biologia molecular e bioquímica, facilitando a escolha de alvos para análise molecular e desenvolvimento de drogas de alvo molecular (Kluwe *et al.*, 2004).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Recrutamento dos Pacientes**

Os pacientes incluídos no presente estudo foram recrutados previamente, no período de agosto de 2013 a maio de 2014. Fizeram parte deste estudo 95 pacientes com NF1, sendo que os mesmos preenchem um dos seguintes critérios (grupos de estudo):

- (a) diagnóstico clínico de NF1, independentemente da idade de acordo com os critérios estabelecidos pelo NIH (Anexo 1);
- (b) Suspeita de doença do espectro da genodermatose NF1, em crianças maiores de quatro anos, por apresentarem alguns dos critérios característicos das doenças, mas não preencherem todos os critérios clínicos descritos anteriormente.

Os dados de avaliação clínica dos pacientes com NF1 foram obtidos a partir de entrevistas com os pacientes e da revisão dos prontuários médicos. A inclusão no estudo foi feita após entrevista e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3) e preenchimento de uma ficha de coleta de dados demográficos e clínicos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA sob o número GPPG 13-0260.

### **4.2 Pesquisa de rearranjos gênicos**

As deleções foram investigadas em DNA extraído previamente a partir de sangue periférico (4mL), utilizando um kit comercial (Flexigene Blood Kit, Qiagen, USA). A estratégia utilizada para analisar os rearranjos está descrita na Tabela 1. Toda a avaliação clínica, incluindo exame físico, análise de dismorfias e a avaliação das escalas de Riccardi e Ablon (Riccardi, 1977 e Ablon, 1996) foram realizados pelos médicos geneticistas do ambulatório de oncogenética do HCPA. A revisão dos fenótipos foi realizada especificamente para os casos com rearranjos pela Dra Cristina Netto.

**Tabela 1.** Estratégia de diagnóstico de grandes rearranjos que foi empregada no estudo.

<b>Grupo (fenótipo)</b>	<b>Etapa 1</b>	<b>Etapa 2</b>
<b>NF1</b>	MLPA P081 e P082	MLPA P122 (quando <i>NF1</i> estiver totalmente deletado)

#### 4.2.1 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A análise de MLPA é utilizada para determinar o número de cópias de até 50 sequências de DNA em uma única reação de PCR *multiplex*, sendo, portanto, útil na detecção de grandes rearranjos comuns nas genodermatoses estudadas. Os kits comerciais (MRC, Amsterdam, The Netherlands) que utilizamos, descritos na Tabela 1, foram escolhidos com o intuito de propiciar a cobertura total dos genes. Em resumo, ocorre a desnaturação do DNA genômico, seguida da hibridização de sondas específicas para os éxons do gene a ser analisado, que ocorre somente na presença das sequências complementares. Após a hibridização, a enzima ligase liga os dois pedaços da sonda, e apenas as sondas hibridizadas e ligadas são amplificadas por PCR em uma etapa seguinte, utilizando *primers* que se ligam a adaptadores presentes nas extremidades das sondas. Todos os kits apresentam sondas referência que hibridizam em genes conhecidos com número de cópias normal em todos os indivíduos. Os produtos de PCR dos pacientes testados e de um controle de DNA comercial em triplicata foram separados por eletroforese capilar. Por fim, foi realizada a normalização dos dados utilizando o *software* Coffalyser.net, que faz uma comparação dos picos do gene de interesse com os picos das sondas referência e com os picos das amostras de DNA de referência (DNA comercial), gerando uma razão entre os picos que será avaliada. Razões < 0,70 são consideradas deleções e razões > 1,40, duplicações. Os kits P081 e P082 possuem sondas que hibridizam em todos os 58 éxons do gene *NF1* e o kit P122 detecta as microdeleções que ocorrem no cromossomo 17q11.2, pois o kit possui 25 sondas para 17 genes que flanqueiam *NF1*, bem como 5 sondas para 5 éxons distintos deste gene. Logo, os pacientes que apresentam deleção de todos os éxons do *NF1* na etapa 1, foram analisados na etapa 2.

### 4.3 Correlações genótipo-fenótipo

Todas as deleções encontradas foram comparadas com as descritas em trabalhos anteriores. A partir das informações encontradas na literatura, inferimos algumas correlações genótipo-fenótipo, no que se trata do tipo de deleção ou dos genes deletados em si.

### 4.4 Análises *in silico*

Os genes presentes na região onde ocorrem as deleções (*CRLF3*, *ATAD5*, *TEFM*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2B*, *EVI2A*, *RAB11FIP4*, *COPRS*, *UTP6*, *SUZ12* E *LRRC37B*) foram analisados *in silico* através de estudos filogenéticos e da investigação das suas estruturas éxon-íntron, sendo que ambas as análises se focaram na ordem dos Primatas.

#### 4.4.1 Escolha dos organismos

Os organismos utilizados nesse estudo foram divididos em *outgroup* (*Canis lúpus familiaris*, *Bos taurus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*), cujas espécies foram escolhidas porque todos os genes estudados estão presentes em seus genomas, e *ingroup* (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Nomascus leucogenys*, *Macaca mulatta*, *Callithrix Jacchus* e *Tarsius syrichta*), com o máximo de representantes possíveis da ordem dos primatas. Todas as espécies utilizadas nas análises *in silico* possuem o genoma sequenciado cujos dados estão disponíveis em bancos de dados.

#### 4.4.2 Análises filogenéticas e de estrutura éxon-íntron

Para a obtenção das sequências dos genes estudados nos organismos descritos acima, foi realizado BlastX para cada gene de cada organismo nos Bancos de dados Ensembl (EMBL-EBI e Wellcome Trust Sanger Institute) e NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando como isca as sequências codificadoras dos genes humanos localizados na região frequentemente deletada do cromossomo 17, obtidas no banco de dados do Metazome (Joint Genome Institute e Center for Integrative Genomics) e confirmadas no NCBI.

Para as análises filogenéticas, as sequências de aminoácidos de cada gene foram alinhadas no programa Muscle (Edgar, 2014) implementado no MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura *et al.*, 2013). Todos os alinhamentos foram checados a olho e quando necessário foram editados e codificados no MEGA 6. O modelo de substituição de aminoácidos para cada grupo de sequências foi estabelecido através do *software* ProtTest (Abascal *et al.*, 2005). As análises filogenéticas foram realizadas, utilizando o método bayesiano, no *software* BEAST (Drummond *et al.*, 2012) utilizando 10.000.000 de gerações. O *software* Tracer (Rambaut A *et al.*, 2013) foi utilizado para verificar a convergência das cadeias de Markov e Monte Carlo. Por fim, a árvore consenso foi gerada através do *software* TreeAnnotator (Pacote Beast - Drummond *et al.*, 2012) e a representação da árvore consenso de cada gene foi visualizada e editada no *software* FigTree (Rambaut A, 2014).

Com a finalidade de compreender a organização estrutural dos genes deletados, análises comparativas da estrutura gênica (organização éxon-íntron) foram realizadas utilizando o *software* online FancyGene (Rambaldi e Ciccarelli, 2009), sendo que os íntrons tiveram seus tamanhos padronizados para 10 pb, pois como a maioria deles apresentava um comprimento considerável, a visualização e a interpretação da figura seria difícil. Além do ser humano, foram escolhidos para a análise um representante do *ingroup* (Chimpanzé) e um representante do *outgroup* (Camundongo).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análises moleculares e descrição clínica

Entre os 95 pacientes analisados, cinco são portadores de deleções (Tabela 2), sendo que três delas já foi descrita.

Um indivíduo (paciente 4) apresentou a microdeleção tipo 1, com o fenótipo muito similar ao descrito na literatura. Os pacientes 1 e 3 apresentaram a deleção da mesma região, classificada em outros estudos como a microdeleção do tipo 2. Neste caso, em especial, apesar do gene *SUZ12* e de seu pseudogene, *SUZ12P*, não estarem indicados como deletados, eles provavelmente estão parcialmente deletados. Isso acontece porque os pontos de quebra da

microdeleção tipo 2 se encontram depois e antes dos éxons onde as sondas do kit de MLPA P122 hibridizam no pseudogene *SUZ12P* e no gene *SUZ12* (ver Figura 2), respectivamente, acarretando na não detecção de suas deleções através da técnica de MLPA. Por fim, o paciente 2 possui uma deleção atípica da região NF1-REPa até o gene *NF1* com um fenótipo similar ao observado em pacientes com mutações no gene *RNF135* (Douglas *et al.*, 2007), enquanto que o paciente 5 é portador da deleção do éxon 13 do gene *NF1*, que não codifica nenhum domínio funcional, mas já é o bastante para o desenvolvimento de um fenótipo grave da doença; ambas as deleções não foram descritas anteriormente.

Entre os sintomas observados nos 5 pacientes, os mais comuns são manchas café com leite, neurofibromas cutâneos e plexiformes, efélides inguinais e axilares, nódulos de Lish e déficit cognitivo. No entanto, alterações ósseas, macrocefalia, dismorfias faciais e supercrescimento também foram observados, mas com menor frequência (Tabela 2).

**Tabela 2:** Dados clínicos e moleculares dos pacientes.

Paciente	Idade	Familiares	Idade atual/ aparecimento dos sintomas	Deleção	Sintomas	Riccardi/ Abion
1	57	Sim	57/~30	CRLF3 - UTP6 (microdeleção tipo 2)	Manchas café com leite, neurofibromas cutâneos, efélides axilares e inguinais	2/moderado
2	14	Não	14/4	SUZ12P - NF1	Manchas café com leite, neurofibromas cutâneos, efélides inguinais, déficit cognitivo, macrocefalia, dismorfias faciais e supercrescimento.	2/moderado
3	46	Sim	46/4	CRLF3 - UTP6 (microdeleção tipo 2)	Manchas café com leite, neurofibromas cutâneos e plexiformes, efélides axilares e inguinais.	2/leve
4	26	Não	26/recém nascida	SUZ12P - LRRC37B (microdeleção tipo 1)	Manchas café com leite, neurofibromas cutâneos e plexiformes, efélides axilares, efélides inguinais, nódulos de Lish, escoliose e déficit cognitivo elevado.	4/moderado
5	21	Sim	21/4	Éxon 13 do gene NF1	Manchas café com leite, neurofibromas cutâneos, neurofibroma plexiforme, efélides axilares, efélides inguinais e nódulos de Lish.	4/leve

## 5.2 Análises *in silico*

As buscas por sequências dos genes deletados nos bancos de dados de genomas dos organismos estudados revelou que todos os genes estão localizados na mesma unidade cromossomal em todos os organismos (Tabela suplementar 2), porém a ordem dos genes nem sempre é a mesma. Dois genes, localizados em outros cromossomos, foram acrescentados ao estudo porque durante as buscas pelas sequências de *ADAP2* e *RAB11FIP4*, os genes *ADAP1* e *RAB11FIP3* apresentaram escores significativos em praticamente todas as espécies (tabela suplementar 2), com exceção do Chimpanzé e do Orangotango que não possuem esses genes em seus genomas. Além disso, o gene *RNF135* está ausente nos genomas do Gibão e do Tarsio, sendo que esse último primata também não possui os genes *LRRC37B* e *ADAP2* (Tabela 3). Já o Orangotango e o Macaco Rhesus não apresentam o gene *ATAD5* em seus genomas. No caso específico do Gorila, o gene *OMG* está ausente em seu genoma, mas *EVI2A* e *EVI2B* estão presentes, mostrando uma possível perda de parte do íntron 27b (onde esses três genes estão localizados) do gene *NF1* que não parece afetar a função proteica.

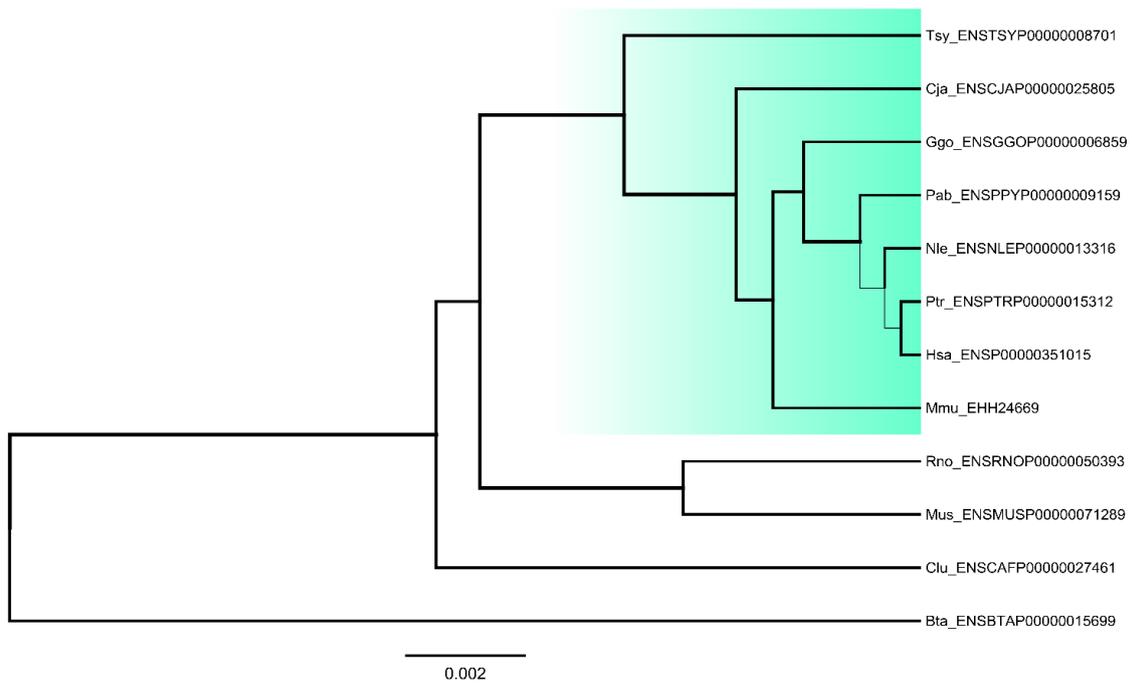
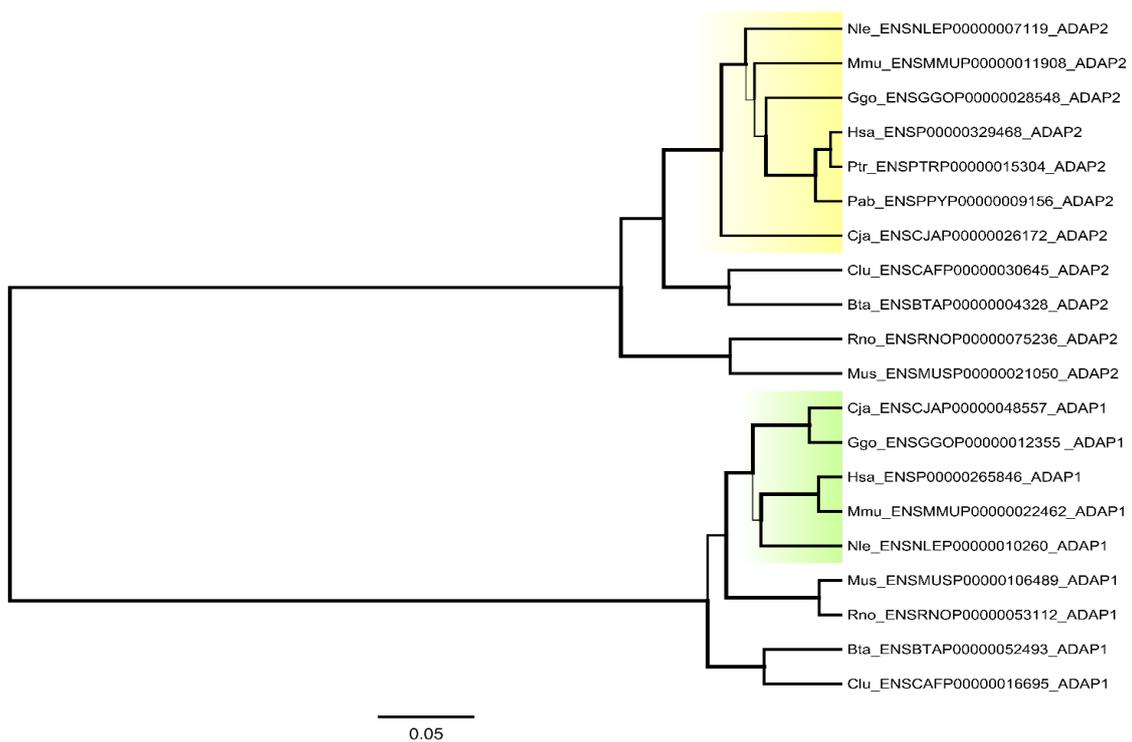
**Tabela 3:** Genes deletados (ou parcialmente deletados) em heterozigose nos pacientes com deleções e genes ausentes nos genomas dos demais organismos estudados.

Genes	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	Hsa	Ptr	Pab	Ggo	Mmu	Nle	Cja	Tsy	Mus	Rno	Clu	Bta
CRLF3																	
ATAD5																	
TEFM																	
ADAP2																	
RNF135																	
NF1						ÉXON 13											
OMG																	
EVI2B																	
EVI2A																	
RAB11FIP4																	
COPRS																	
UTP6																	
SUZ12																	
LRRC37B																	

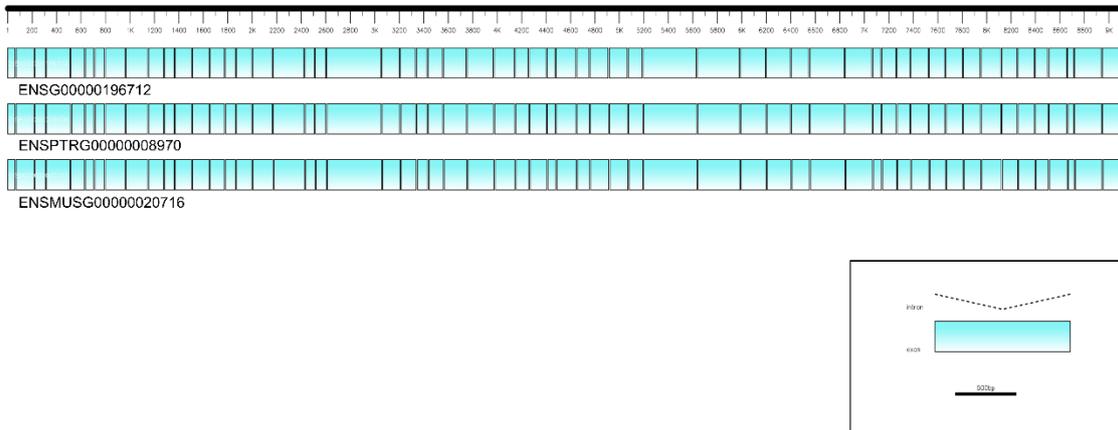
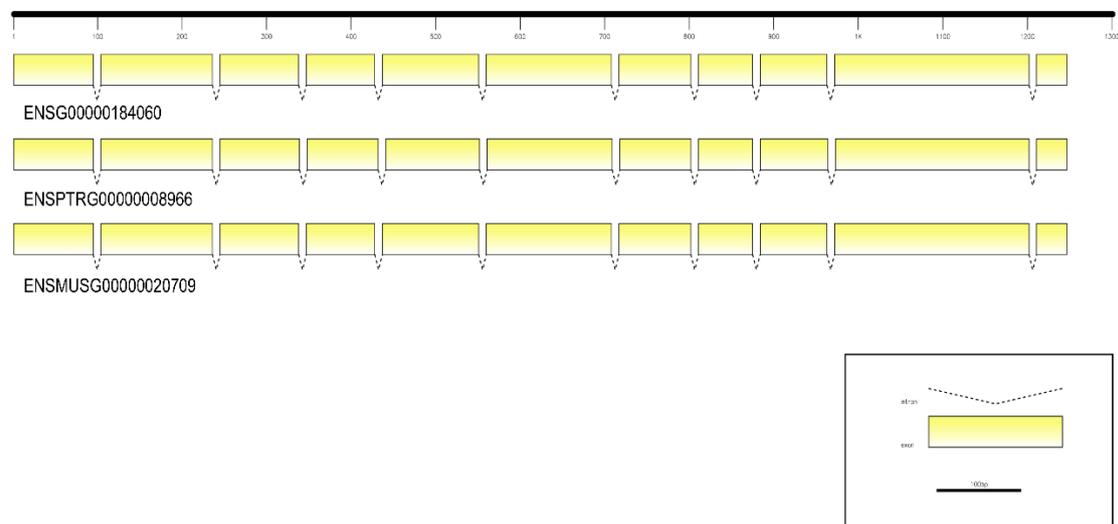
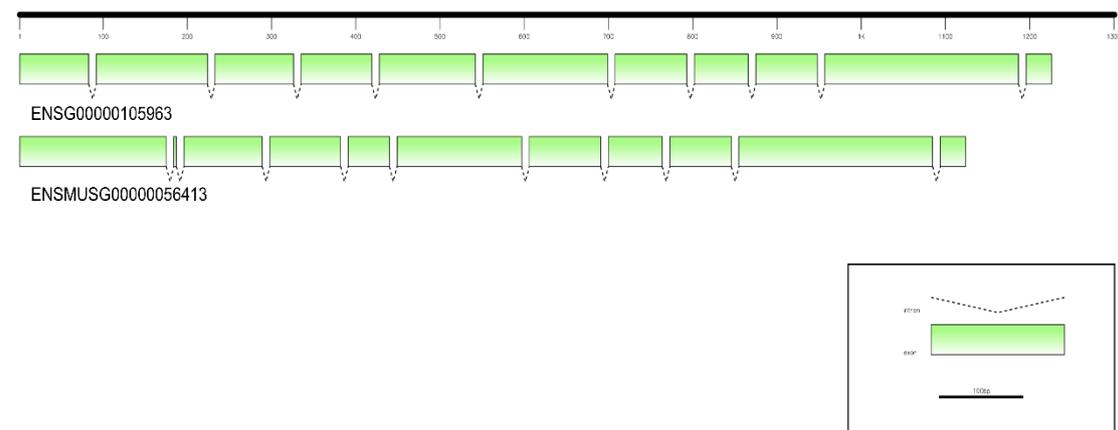
As análises filogenéticas foram realizadas a partir do alinhamento das sequências proteicas de cada gene presente no bloco deletado entre todos os organismos estudados. É possível perceber que as árvores exibem topologias similares e apresentam suporte estatístico. Porém, uma observação intrigante é o fato de que a maioria das árvores não recuperou o clado Gorila-Chimpanzé-Humano, mas para poder entender esse resultado será necessário analisar com atenção se a escolha da sequência de aminoácidos para a análise foi correta ou se esse fato aconteceu devido a algum evento evolutivo.

Examinando as árvores filogenéticas, os alinhamentos das sequências e a organização éxon-ítron, foi possível perceber uma elevada conservação dos genes entre as espécies, principalmente dos domínios funcionais codificados pelos mesmos, na maioria dos casos (Figuras 3 e 4, Tabela suplementar 3 e Figuras suplementares 1 e 2). Em geral, as sequências de cada proteína apresentam um tamanho similar entre as espécies.

Os genes *LRRC37B* e *RNF135* apresentaram uma variação considerável entre suas sequências nas espécies estudadas, inclusive várias possíveis cópias do *LRRC37B* foram descartadas (células vermelhas da tabela suplementar 2), devido à alta variação das mesmas que dificultava o andamento das análises. O fato das buscas sobre o gene *LRRC37B* apresentarem várias sequências na maioria das espécies, dificulta na interpretação dos resultados porque não é possível inferir se todas essas sequências são funcionais, pois esse gene possui várias cópias de pseudogenes em diferentes espécies (Giannuzzi *et al.*, 2013). O gene *RNF135* parece ser um fator de transcrição, devido a presença de domínios dedo de zinco, fato que explicaria a menor conservação encontrada fora da sequência que corresponde aos domínios proteicos, característica comum em fatores de transcrição (Phillips and Hoopes, 2008). Os genes *ADAP2* e *ADAP1* exibem dois clados bem suportados, inclusive para os organismos não primatas, apontando para o fato desses genes serem parálogos que se originaram de uma duplicação gênica antiga. O mesmo pode ser observado para *RAB11FIP3* e *RAB11FIP4*. As sequências proteicas codificadas pelos genes *NF1*, *OMG*, *RAB11FIP4* e *SUZ12* são as mais conservadas de todas, 94,4%, 80,9% 80,8% e 80,4% respectivamente (Tabela suplementar 3), indicando suas importâncias funcionais. Os genes *OMG*, *EVI2A* e *EVI2B* estão localizados no íntron 27b do gene *NF1*, mas apenas a proteína codificada pelo gene *OMG* é muito conservada, o que reforça a importância funcional deste polipeptídeo.

**A****B**

**Figura 3:** Análises filogenéticas dos genes *NF1*, *ADAP2* e *ADAP1*. **A** – Filogenia do gene *NF1*. **B** – Filogenia dos genes *ADAP1* e *ADAP2*. A probabilidade posterior com valores acima de 0,90, está representada pelas linhas mais espessas, enquanto que valores menores de probabilidade são retratados por linhas finas.

**A****B****C**

**Figura 4:** Organização das estruturas éxon-íntron dos genes **A** - *NF1*, **B** - *ADAP2* e **C** - *ADAP1*. A primeira estrutura de cada figura é referente a espécie humana, a segunda ao chimpanzé e a terceira ao camundongo.

## 6 CONCLUSÃO

Em se tratando de correlações entre genótipo e fenótipo, algumas relações puderam ser feitas. O paciente 2 apresentou dismorfia facial, alta estatura e macrocefalia, que podem estar relacionados com a haploinsuficiência de *RNF135*. Como esse fenótipo não é observado nos demais pacientes que apresentam a deleção deste gene, a avaliação da expressão e de alterações no alelo restante do gene *RNF135* é de grande interesse para estudos posteriores. O indivíduo 4 é portador da microdeleção tipo 1 e seu fenótipo é semelhante ao esperado, pois este indivíduo apresenta o quadro clínico mais grave.

O paciente 5 possui a deleção do éxon 13 do gene *NF1*, esse éxon não é responsável pela atividade funcional da proteína codificada, mas provavelmente é muito importante para o dobramento correto da mesma, prejudicando sua funcionalidade. Corroborando para explicar este caso, a porcentagem de aminoácidos conservada superior a 90% em *NF1*, entre as espécies avaliadas, é um indício de pequenas alterações em qualquer éxon desse gene podem causar um efeito fenotípico significativo.

Em se tratando dos 2 pacientes que possuem a mesma região deletada, é possível perceber que os sintomas são semelhantes, com exceção dos neurofibromas plexiformes que acometem apenas um dos indivíduos (paciente 3). Esse acontecimento pode ser explicado pelo fato de muitos pacientes com a microdeleção tipo 2 frequentemente apresentarem mosaïcismo somático (Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2004), tornando interessante avaliar se isso realmente ocorre em algum desses dois casos. Porém, a possibilidade de aparecimento desse tipo de neurofibroma e de tumores mais agressivos não pode ser descartada, principalmente porque os pacientes portam microdeleções, o que indica a importância do diagnóstico molecular para o manejo clínico adequado desses indivíduos.

As proteínas ADAP2 e ADAP1 são isoformas da subfamília ADAP e compartilham 51-59% de suas sequências em humanos (Whitley *et al.*, 2002), com a mesma organização de seus domínios, além de ambas serem expressas no cérebro e interagirem com os microtúbulos (Zuccotti *et al.*, 2012; Stricker *et al.*, 2014). RAB11FIP3 e RAB11FIP4 (também com sequências similares) foram mostradas interagindo com a subfamília ADAP para controlar o tráfico da membrana durante a citocinese (Fielding *et al.*, 2005), demonstrando que esses

genes também parecem dividir funções semelhantes. Esses dados apresentam a possibilidade de um gene suprir a necessidade funcional do outro, em casos extremos, como a deleção dos genes *ADAP2* e *RAB11FIP4*. Por esse motivo, os quatro genes podem ser modificadores de fenótipo.

As sequências proteicas codificadas pelos genes *SUZ12* e *OMG* apresentam elevada conservação, principalmente em primatas maiores, demonstrando a importância de suas funções. Essas observações indicam que pesquisas relacionadas a estes genes podem trazer mais informações sobre a influência dos mesmos no fenótipo de indivíduos com neurofibromatose tipo 1.

Resumindo, além de *NF1*, seria interessante avaliar se a procura por alterações nos genes *RNF135* e *SUZ12* deve ser acrescentada às análises moleculares realizadas no HCPA, nos casos clínicos de neurofibromatose tipo 1. Os genes *RNF135*, *SUZ12*, *OMG*, *ADAP2*, *ADAP1*, *RAB11FIP4* e *RAB11FIP3* são fortes candidatos a serem modificadores de fenótipo, podendo fazer parte de estudos posteriores.

## 7 PERSPECTIVAS

- a) Confirmar as deleções (validar a técnica para uso em diagnóstico molecular), encontradas pela técnica de MLPA, e descrever seus pontos de quebra através do método a-CGH de alta resolução.
- b) Analisar a expressão dos genes encontrados na região estudada, utilizando dados de microarranjo disponíveis em bancos de dados.
- c) Avaliar se há seleção positiva de algum dos genes frequentemente deletados.
- d) Convidar os familiares, com diagnóstico de NF1, dos pacientes com microdeleção para participarem da pesquisa.
- e) Procurar por alterações nos genes *RNF135* e *SUZ12* nos pacientes.
- f) Analisar a expressão gênica de *ADAP2* e *ADAP1* nos pacientes com grandes rearranjos.
- g) Fazer as análises filogenéticas com as sequências nucleotídicas dos genes, para compararmos se o respectivo resultado é melhor do que o obtido com as sequências de aminoácidos.

## 8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O rastreamento mais completo dos sintomas durante o acompanhamento do paciente ainda precisa ser otimizado, para que as correlações entre genótipo e fenótipo possam ser mais efetivas.

O excessivo número de cópias do pseudogene LRRC37BP, acabam dificultando na escolha das sequências referentes ao gene LRRC37B.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrew B Fielding, Eric Schonteich, Johanne Matheson, Gayle Wilson (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J* 24: 3389-99.

Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A *et al.* (2003) Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *J Med Genet* 40:e82.

Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.

BEAST (Versão 1.8.2) - Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973. Disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/downloads>.

Bengesser K, Cooper DN, Steinmann K, Kluwe L, Chuzhanova NA, Wimmer K, Tatagiba M, Tinschert S, Mautner V-F and Kehrer-Sawatzki H (2010) A novel third type of recurrent *NF1* microdeletion mediated by nonallelic homologous recombination between *LRRC37B*-containing low-copy repeats in 17q11.2. *Hum. Mutat.*, 31: 742–751.

Burrows NP (2009) Genodermatoses. *Dermatology* 37: 298-302.

Clementi M, Boni S, Mammi I, Favarato M, Tenconi R (1996) Clinical application of genetic polymorphism in neurofibromatosis type 1. *Ann Genet* 39:92–96.

De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H *et al.*, (2014) PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature* nature13561.3d.

De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, Frahm S, Sciot R, Legius E. 2003. Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum Genet* 72: 1288–1292.

Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K (2000) *NF1* microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum Mol Genet* 9:35–46.

- Douglas J, Cilliers D, Coleman K, Tatton-Brown K, Barker K, Bernhard B, *et al.* (2007) Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nature Genetics* 39: 963-965.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Evans DG, Howard E, Giblin C, Clancy T, Spencer H, Huson SM, Lalloo F. 2010. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: Estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet Part A* 152A:327–332.
- Ensembl - EMBL-EBI e Wellcome Trust Sanger Institute (2015). Disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>.
- FancyGene - Rambaldi D. and Ciccarelli F.D. (2009) FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics.* 25: 2281-2. Disponível em <http://bio.ieo.eu/fancygene/>.
- Ferner RE (2010) The neurofibromatoses. *Pract Neurol* 10: 82–93.
- Fielding A B, Schonteich E, Matheson J , Wilson G, et al. (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *The EMBO Journal* 24: 3389–3399.
- Friedman JM 1, Birch PH (1997) Neurofibromatose tipo 1: a análise descritiva do transtorno em 1.728 pacientes. *Am J Med Genet* 70 (2): 138-43.
- Garcia-Linares C, Fernández-Rodríguez J, Terribas E, Mercadé J, Pros E (2010) Dissecting Loss of Heterozygosity (LOH) in Neurofibromatosis Type 1-Associated Neurofibromas: Importance of Copy Neutral LOH. *Human Mutation* 32: 78–90.
- Giannuzzi G, Siswara P, Malig M, Marques-Bonet T (2013) Evolutionary dynamism of the primate LRRC37 gene family. *Genome Research* 23:46–59.
- Grisart B, Rack K, Vidrequin S, Hilbert P, Deltenre P, Verellen-Dumoulin C, Destrée A (2008) NF1 microduplication first clinical report: association with mild mental retardation, early onset of baldness and dental enamel hypoplasia? *Eur J Hum Genet* 16:305–311.
- Jenne DE, Tinschert S, Dorschner MO, Hameister H, Stephens K, Kehrer-Sawatzki H. (2003) Complete physical map and gene content of the human NF1 tumor suppressor region in human and mouse. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 111-20.
- Jin H, Selfe J, Whitehouse C, Morris JR, Solomon E, Roberts RG. 2004. Structural evolution of the BRCA1 genomic region in primates. *Genomics* 84: 1071–1082.
- Johnson ME, Viggiano L, Bailey JA, Abdul-Rauf M, Goodwin G, Rocchi M, Eichler EE. 2001. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature* 413: 514–519.
- Kayes LM, Burke W, Riccardi VM, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens K (1994) Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. *Am J Hum Genet.* 54: 424–436.
- Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, Kohn M, Wimmer K, Krammer U, Peyrl A, Jenne DE, Hansmann I, Mautner VF (2004) High frequency of mosaicism among patients

- with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JJAZ1 gene. *Am J Hum Genet* 75: 410-423.
- Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner V-F (2004) Screening of 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the *NF1* gene. *Hum Mutat* 23:111–116.
- Le LQ and Parada LF (2007) Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene* 26: 4609–4616.
- López-Correa C, Brems H, Lazaro C, Marynen P, Legius E (2000) Unequal meiotic crossover: a frequent cause of *NF1* microdeletions. *Am J Hum Genet* 66:1969–1974.
- Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammert S, Högel J *et al.* (2010) Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 *NF1* deletions. *J Med Genet* 47: 623–630.
- MEGA 6 - Molecular Evolutionary Genetic Analysis. Autores: Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, and Sudhir Kumar. Disponível em <http://www.megasoftware.net/>.
- Messiaen LM, Wimmer K. *NF1* mutational spectrum. In: Kaufmann D, ed. *Neurofibromatoses*. Monographs in Human Genetics. Vol 16. Basel, Switzerland: Karger; 2008: 63-77.
- Metazome - Joint Genome Institute e Center for Integrative Genomic (2006-2015 University of California). Software: David M. Goodstein, Rusty Howson, Rochak Neupane, Shengqiang Shu. Análises: Bill Dirks, Uffe Hellsten, Therese Mitros, Dan Rokhsar. Disponível em <http://www.metazome.net/>.
- Miriam Spiegel<sup>1</sup>, Konrad Oexle<sup>2,3</sup>, Denise Horn<sup>1</sup>, Elke Windt<sup>3</sup>, Annegret Buske *et al.* (2005) Childhood overgrowth in patients with common *NF1* microdeletions. *European Journal of Human Genetics* 13, 883–888.
- Moles KJ, Gowans GC, Gedela S, Beversdorf D, Yu A, Seaver LH *et al.* (2012) *NF1* microduplications: identification of seven nonrelated individuals provides further characterization of the phenotype. *Genetics in medicine* 14: 508-514.
- Murray D, Doran P, MacMathuna P and Moss A C (2007) *In silico* gene expression analysis – an overview. *Molecular Cancer*, 6:50.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Nunley KS, Gao F, Albers AC, Bayliss SJ, Gutmann DH (2009) Predictive value of café au lait macules at initial consultation in the diagnosis of neurofibromatosis type 1. *Arch Dermatol* 145: 883–887.
- Pasmant E, Masliah-Planchon J, Lévy P, Laurendeau I, Ortonne N *et al.*, (2011) Identification of Genes Potentially Involved in the Increased Risk of Malignancy in *NF1*-Microdeleted Patients. *Mol Med* 17: 79-87.
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuáñez HN, Horvath JE, *et al.* (2011) A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genet* 7(3): e1001342.

- Petek E, Jenne DE, Smolle J, Binder B, Lasinger W, Windpassinger C, Wagner K, Kroisel PM, Kehrer-Sawatzki H (2003) Mitotic recombination mediated by the JJAZF1 (KIAA0160) gene causing somatic mosaicism and a new type of constitutional NF1 microdeletion in two children of a mosaic female with only few manifestations. *J Med Genet* 40: 520-5.
- Phillips, T. & Hoopes, L. (2008) Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education* 1(1):119.
- Piddubnyak V, Rigou P, Michel L, Rain J-C, Geneste O, Wolkenstein P, Vidaud D, Hickman JA, Mauviel A and Poyet J-L (2007) Positive regulation of apoptosis by HCA66, a new Apaf-1 interacting protein, and its putative role in the physiopathology of NF1 microdeletion syndrome patients. *Cell Death and Differentiation* 14: 1222–1233.
- ProtTest - Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104-2105. Disponível em <http://darwin.uvigo.es/>.
- Rambaut A (2013) FigTree. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ (2014) Tracer v1.6. Disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen J S, Hinrichs A S, Hou M (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research* 15: 1034-1050.
- Spiegel M, Oexle K, Horn D, Windt E, Buske A, Albrech B, et al. (2005) Childhood overgrowth in patients with common *NF1* microdeletions. *European Journal of Human Genetics* 13: 883–888.
- Stricker R and Reiser G (2014) Functions of the neuron-specific protein ADAP1 (centaurin- $\alpha$ 1) in neuronal differentiation and neurodegenerative diseases, with an overview of structural and biochemical properties of ADAP1. *Biological Chemistry* 395: 1321–1340.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Terzi Y K, Oğuzkan-Balcı S, Anlar B, Erdoğan-Bakar E and Ayter S (2011) Learning disability and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMGP) gene in neurofibromatosis type 1. *The Turkish Journal of Pediatrics* 53: 75-78.
- The Human Gene Mutation Database (2013). Disponível em <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Upadhyaya M and Cooper DN (2012) Neurofibromatosis Type 1 – Molecular em Cellular Biology.
- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S *et al.* (2007) 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* 80:140–151.

- Venturin M, Guarnieri P, Natacci F, Stabile M, Tenconi R, Clementi M, Hernandez C, Thompson P, Upadhyaya M, Larizza L, Riva P (2004) Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *J Med Genet* 41: 35–41.
- Vogt J, Kohlhasse J, Morlot S, Kluwe L, Mautner V-F, Cooper D N and Kehrer-Sawatzki H (2011) Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis type 1 due to a postzygotic *NF1* gene mutation. *Human Mutation* 32: e2134-e2147.
- Vourc'h P, Moreau T, Arbion F, Marouillat-Ve'drine S, Mu'h J-P and Andres C (2003) Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidyl-inositol anchor. *Journal of Neurochemistry* 85: 889–897.
- Xu GF, *et al.* (1990) The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 63: 835-41.
- Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M *et al.* (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62: 599-608.
- Zhang M, Wang Y, Jones S, Sausen M, McMahon K, Sharma R, Wang Q *et al.*, (2014) Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nature Genetics* 46: 1170-1173.
- Zuccotti P, Cartelli D, Stroppi M, Pandini V, Venturin M, *et al.* (2012) Centaurin- $\alpha$ 2 Interacts with  $\beta$ -Tubulin and Stabilizes Microtubules. *PLoS ONE* 7: e52867.
- Walker L, Thompson D, Easton D, Ponder B, Ponder M, Frayling I, Baralle D *et al* (2006) A prospective study of neurofibromatosis type 1 cancer incidence in the UK. *Br J Cancer* 95:233–238.
- Wang Y, You F M, Lazo G R, Luo M-C, Thilmony R *et al.* (2012) PIECE: a database for plant gene structure comparison and evolution. *Nucleic Acids Research* 41: 1159-1166.
- Whitley P, Gibbard A M, Koumanov F, Oldfield S, Kilgour E E, Prestwich G D, Holman G D (2002) Identification of centaurin- $\alpha$ 2: a phosphatidylinositide-binding protein present in fat, heart and skeletal muscle. *Eur J Cell Biol.* 81: 222-30.
- Wimmer K, Yao S, Claes K *et al.* (2005) Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45: 265–276.
- Wu BL, Austin MA, Schneider GH, Boles RG, Korf BR (1995) Deletion of the entire *NF1* gene detected by the FISH: four deletion patients associated with severe manifestations. *Am J Med Genet*, 59: 528–535.

**ANEXO 1.** Critérios de diagnóstico clínico para a neurofibromatose tipo 1.

**Critérios diagnósticos segundo o *National Institutes of Health* (EUA), para NF1.**

- 1 – Seis ou mais manchas café-com-leite
  - > de 0,5 cm no maior diâmetro em indivíduos pré-puberais, ou
  - > de 1,5 cm no maior diâmetro em indivíduos pós-puberais
- 2 - Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um neurofibroma plexiforme
- 3 - Efélides na região axilar ou inguinal
- 4 - Glioma óptico
- 5 - Dois ou mais nódulos de Lisch (hamartomas de íris)
- 6 - Lesão óssea distinta, como a displasia do esfenóide ou adelgaçamento do córtex dos ossos longos com ou sem pseudoartrose.
- 7 - Familiar de primeiro grau (pai/mãe, irmão/irmã, filho/filha) com NF1 diagnosticado pelos critérios acima.

## ANEXO 2: material suplementar

**Tabela suplementar 1: principais informações funcionais sobre os genes frequentemente deletados nos grandes rearranjos em NF1.**

Gene (sigla)	Nome	Também conhecido	Informações sobre a proteína	Referências
<i>CRLF3</i>	cytokine receptor-like factor	FRWS, CRLM9; CYTOR4	Regulador negativo do ciclo celular, com a possibilidade de regular negativamente a progressão do ciclo celular na fase G0 / G1. Estudos sobre a proteína em ratos sugerem que a mesma pode regular a morfologia neuronal e a biogênese de vesículas sinápticas.	1) Yang F <i>et al.</i> , 2009 2) Hashimoto Y <i>et al.</i> , 2012
<i>ATAD5</i>	ATPase family, AAA domain containing 5	ELG1; C17orf41	Importante para suprimir a instabilidade genômica. Relacionado com predisposição a câncer quando sua função é prejudicada. Atua na via BCL2/BAx, que desempenha um papel central na determinação do futuro da célula, reparo do DNA ou apoptose.	1) Bell DW <i>et al.</i> 2) Sikdar N <i>et al.</i> , 2009 3) Ishii H <i>et al.</i> , 2005
<i>ADAP2</i>	ArfGAP with dual PH domains 2	ARFGAP; CENTA2	Expresso no músculo esquelético, fígado (em humanos) e no cérebro com uma expressão mais elevada no coração e aorta (em humanos e ratos). Segundo o Gene Ontology essa proteína está envolvida no desenvolvimento do coração e na regulação positiva da atividade de GTPase. Pode ser um gene candidato a estar envolvido com anormalidades cardíacas específicas em pacientes com NF1.	1) Venturin M <i>et al.</i> , 2004 2) Venturin M <i>et al.</i> , 2014
<i>RNF135</i>	ring finger protein 135	Riplet	Relacionado com supercrescimento e dismorfismo facial em pacientes com NF1, bem como com dificuldades de aprendizagem. Porém essas características são atenuadas com o passar do tempo (até a fase adulta).	1) Douglas J, <i>et al.</i> , 2007
<i>NF1</i>	neurofibrina 1	WSS	Regulador negativo da via de transdução de sinal RAS. A inativação do gene <i>NF1</i> resulta na ativação constitutiva da via RAS, aumentando a proliferação celular e a chance de desenvolvimento de tumores.	1) Barbacid <i>et al.</i> , 1987
<i>UTP6</i>	UTP6, small subunit (SSU) processome component	HCA66; C17orf40	Componente do centrosoma, o principal centro de organização dos microtúbulos (MTOC) em células de mamíferos, necessária para a duplicação do centríolo e montagem do fuso mitótico. Potencializa o efeito de Apaf-1, que por sua vez desempenha um papel central na ativação da caspase mitocondrial, na via de apoptose. As células desprovidas de UTP6 foram severamente prejudicadas em se tratando de apoptose dependente de apoptossomo.	1) Piddubnyak V, <i>et al.</i> , 2007 2) Fant X, <i>et al.</i> , 2009
<i>SUZ12</i>	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	CHET9; JJAZ1	Componente central do complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2), está implicado em silenciamento transcricional através da geração de di e tri metilações da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3). O complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) exerce efeitos oncogênicos em muitos tipos de tumor. A perda de SUZ12 potencializa os efeitos de mutações em NF1 por amplificação dirigida da transcrição de Ras, através de efeitos sobre a cromatina. É importante salientar, no entanto, que a inativação de SUZ12 também aciona um interruptor epigenético que sensibiliza estes cânceros quando tratados com inibidores de bromodominios.	1) De Raedt T, <i>et al.</i> , 2014 2) Liu C <i>et al.</i> , 2014 3) Zhang M <i>et al.</i> , 2014
<i>LRRC37B</i>	leucine rich repeat containing 37B, C66 SLIT-like testicular protein	LRRC37; KIAA0563	Segundo o Expression Atlas (EMBL-EBI) os órgãos com expressão mais significativa são: Cerebelo, Testículo, tireóide, glândula pituitária, pulmão, nodo linfático e medula óssea. Os motivos LRR são importantes para as interações intermoleculares, com fatores intercelulares exógenos no sistema imune e/ou com tipos celulares diferentes no sistema nervoso em desenvolvimento.	1) Giuliana Giannuzzi, <i>et al.</i> , 2013 2) <a href="http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000185158">http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000185158</a>
<i>OMG</i>	oligodendrocyte myelin glycoprotein	OMGP	Localizado dentro do gene <i>NF1</i> , é expresso no cérebro e já foi associado com distúrbio cognitivo, porém em um estudo sobre NF1, essa associação não foi significativa. Atua na regulação do crescimento celular.	1) Terzi YK, <i>et al.</i> , 2011 2) Vourc'h P, <i>et al.</i> , 2003
<i>EVI2A</i>	ecotropic viral integration site 2A	EVDA; EV1-2A	Foi mostrado que sua expressão está abaixo do normal em tumores malignos da bainha do nervo periférico	Pasmant, <i>et al.</i> , 2011
<i>EVI2B</i>	ecotropic viral integration site 2B	EVDB	Foi mostrado que sua expressão está abaixo do normal em tumores malignos da bainha do nervo periférico	Pasmant, <i>et al.</i> , 2011
<i>RAB11FIP4</i>	RAB11 Family Interacting Protein 4 (Class II)	RAB11-FIP4; KIAA1821	As proteínas da grande família de Rab GTPase têm papéis reguladores na formação, direcionamento e fusão de vesículas de transporte intracelulares. RAB11FIP4 é uma das muitas proteínas que regulam e interagem com GTPases Rab.	1) Fielding AB, <i>et al.</i> , 2005 2) Wallace DME, <i>et al.</i> , 2002.
<i>TEFM</i>	Transcription Elongation Factor Of Mitochondria	C17orf42	Aumenta a transcrição de RNA polimerase mitocondrial. Regula a transcrição do genoma mitocondrial, incluindo os genes importantes para o mecanismo de fosforilação oxidativa.	1) Minczuk M, <i>et al.</i> , 2011 2) Posse V <i>et al.</i> , 2015
<i>COPRS</i>	Coordinator Of PRMT5, Differentiation Stimulator	C17orf79	A proteína de ligação de histona é necessária para a atividade metiltransferase na histona H4 de PRMT5. Especificamente necessária para metilar a histona H4 na Arg-3, modula a especificidade de substrato de PRMT5. COPRS liga-se ao terminal amino de histona H4 e nucleossomas, sugerindo que é um importante adaptador de PRMT5. Desempenha um papel na diferenciação de células musculares, modulando o recrutamento de PRMT5 para o promotor de genes envolvidos na coordenação entre a saída do ciclo celular e a diferenciação do músculo.	1) Lacroix M, <i>et al.</i> , 2008 2) Paul C <i>et al.</i> , 2012
<i>MIR365-2</i>	microRNA 365b	mir-365b; hsa-mir-365b	A expressão ectópica de miR-365B-3p atenua significativamente o crescimento celular, induz a parada do ciclo celular na fase G1 e a apoptose de célula através da inibição da expressão de PAX6, diretamente pela ligação em suas regiões 3' não traduzidas. Além disso, a superexpressão de miR-365B-3p regula positivamente p21 e p27, mas regula negativamente cdc2 e ciclina D1 níveis de proteína.	1) Wang J, <i>et al.</i> , 2013
<i>MIR193A</i>	microRNA 193a	MIRN193	MicroRNA anti-proliferativo. Sua superexpressão inibiu a incorporação de BrdU em células cancerosas, indicando que ele afeta o ciclo celular, além de induzir a ativação da caspase 3/7, resultando em morte celular por apoptose. Potenciais alvos: ARHGAP19, CCND1, erbB4, KRAS e MCL1	1) Nakano H, <i>et al.</i> , 2013

- Ablon J (1996) Gender response to neurofibromatosis 1. *Soc Sci Med* 42: 99-109.
- Bell DW, Sikdar N, Lee K-y, Price JC, Chatterjee R, *et al.* (2011) Predisposition to Cancer Caused by Genetic and Functional Defects of Mammalian Atad5. *PLoS Genet* 7(8): e1002245.
- Fant X, Gnadt N, Haren L and Merdes A (2009) Stability of the small  $\gamma$ -tubulin complex requires HCA66, a protein of the centrosome and the nucleolus. *Journal of Cell Science* 122: 1134-1144.
- Fielding AB, Schonteich E, Matheson J, Wilson G (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *The EMBO Journal* 24: 3389–3399.
- Hashimoto Y, Muramatsu K, Kunii M, Yoshimura S, *et al.* (2012) Uncovering genes required for neuronal morphology by morphology-based gene trap screening with a revertible retrovirus vector. *The FASEB Journal* 26: 4662-4674.
- Kapushesky, M. *et al.* (2012) Gene Expression Atlas update - a value-added database of microarray and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Research* 40:D1077-D1081.
- Lacroix M, Messaoudi SE, Rodier G, Cam AL, *et al.* (2008) The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO reports* 9: 452-458.
- Liu C, Shi X, Wang L, Wu Y, Jin F, Bai C and Song Y (2014) SUZ12 is involved in progression of non-small cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis. *Tumor Biol* 35: 6073–6082.
- Minczuk M, He J, Duch AM, Ettema TJ (2011) TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research* 39: 4284–4299.
- Nakano H, Yamada Y, Miyazawa T e Yoshida T (2013) Gain-of-function microRNA screens identify mir-193a regulating proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *International journal of oncology* 42: 1875-1882.
- Paul C, Sardet C, and Fabbrizio E (2012) The histone- and PRMT5-associated protein COPR5 is required for myogenic differentiation. *Cell Death and Differentiation* 19: 900–908.
- Posse V, Shahzad S, Falkenberg M, Hällberg BM, and Gustafsson CM (2015) TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Research* 43: 2615–2624.
- Riccardi VM, Kleiner B (1977) Neurofibromatosis: a neoplastic birth defect with two age peaks of severe problems. *Birth Defects Orig Artic Ser* 13: 131-8.
- Sikdar N, Banerjee S, Lee K, Wincovitch S, *et al.* (2009) DNA damage responses by human ELG1 in S phase are important to maintain genomic integrity. *Cell Cycle* 8: 3199–3207.
- Venturin M, Carra S, Gaudenzi G, *et al.* (2014) ADAP2 in heart development: a candidate gene for the occurrence of cardiovascular malformations in NF1 microdeletion syndrome. *J Med Genet* (7): 436-43.

Wallace DME, Lindsay AJ, Hendrick AG and McCaffrey MW (2002) Rab11-FIP4 interacts with Rab11 in a GTP-dependent manner and its overexpression condenses the Rab11 positive compartment in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299: 770–779.

Jianwen Wang J, Xiaochun Wang X, Guiling Wu G, Dingshan Hou D, Qi Hu Q ()MiR-365b-3p, down-regulated in retinoblastoma, regulates cell cycle progression and apoptosis of human retinoblastoma cells by targeting PAX6. *FEBS Letters* 587: 1779–1786.

Yang F, Xu Y-P, Li J, Duan S-S, *et al.* (2009) Cloning and characterization of a novel intracellular protein p48.2 that negatively regulates cell cycle progression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 2240–2250.

**Tabela suplementar 2:** informações sobre as sequências obtidas nos bancos de dados Ensembl e NCBI. As sequências proteicas excluídas do estudo por serem muito diferentes das demais, estão em vermelho. Dois genes, ADAP1 e RAB11FIP3, que não estão na região frequentemente deletada em pacientes com neurofibromatose, foram adicionados pois apresentaram scores consideráveis.

Espécie	Gene	Código proteico	Nome do locus	Gene	Nº de transcritos	localização genômica	Comp.	Escore	E-valor	%ID
Gado (Bos taurus - Bta) 60 cromossomos (29+X)	<i>CRLF3</i>	ENSBTAP00000024457	ENSBTAG00000018381	<i>CRLF3</i>	1	19:18456491-18497475	438	642	0.0	95.66
	<i>ATAD5</i>	ENSBTAP00000024464	ENSBTAG00000018383	<i>ATAD5</i>	1	19:18411252-18445391	1868	1955	0.0	76.77
	<i>ADAP2/ADAP1</i>	ENSBTAP0000004328	ENSBTAG00000003334	<i>ADAP2</i>	1	19:18354230-18388232	383	517	0.0	87.21
	<i>ADAP1</i>	ENSBTAP00000052493	ENSBTAG00000015952	<i>ADAP1</i>	1	25:42330113-42362774	347	359	2,00E-132	61.67
	<i>RNF135</i>	ENSBTAP00000022890	ENSBTAG00000017225	<i>RNF135</i>	1	19:18331445-18343178	435	412	1,00E-153	64.60
	<i>NF1</i>	ENSBTAP00000015699	ENSBTAG00000011829	<i>NF1</i>	2	19:18973027-19183670	2827	4131	0.0	97.17
	<i>UTP6</i>	ENSBTAP00000020740	ENSBTAG00000015612	<i>UTP6</i>	1	19:18570929-18596526	598	703	0.0	74.75
	<i>SUZ12</i>	ENSBTAP00000024971	ENSBTAG00000018752	<i>SUZ12</i>	1	19:18507875-18544756	659	1031	0.0	99.24
	<i>OMG</i>	ENSBTAP00000035220	ENSBTAG00000025213	<i>OMG</i>	1	19:19045123-19046406	428	571	0.0	95.09
	<i>LRRC37B</i>	ENSBTAP0000004849	ENSBTAG00000027274	<i>ENSBTAG00000027274</i>	2	19:45804030-45845485	850	424	7,00E-147	42.35
	<i>EVI2A</i>	ENSBTAP00000012311	ENSBTAG00000009354	<i>EVI2A</i>	1	19:19023409-19024104	232	279	1,00E-101	79.74
	<i>EVI2B</i>	ENSBTAP00000012309	ENSBTAG00000009353	<i>EVI2B</i>	1	19:19034875-19036206	445	407	2,00E-151	67.19
	<i>RAB11FIP4/RAB11FIP3</i>	ENSBTAP00000022573	ENSBTAG00000016972	<i>RAB11FIP4</i>	1	19:18851512-18886471	526	673	0.0	94.11
	<i>TEFM</i>	ENSBTAP00000024467	ENSBTAG00000018386	<i>C19H17orf42</i>	1	19:18400772-18407786	354	420	1,00E-157	76.55
	<i>COPRS</i>	ENSBTAP0000002453	ENSBTAG0000001885	<i>COPRS</i>	1	19:18604745-18608931	173	219	8,00E-78	76.88
	Sagui (Callithrix jacchus - Cja) 48 cromossomos (22+X+Y)	<i>CRLF3</i>	ENSCJAP00000026067	ENSCJAG00000014163	<i>CRLF3</i>	3	5:92519493-92566475	442	653	0.0
<i>ATAD5</i>		ENSCJAP00000026098	ENSCJAG00000014179	<i>ATAD5</i>	1	5:92433480-92513351	1847	2253	0.0	87.82
<i>ADAP2/ADAP1</i>		ENSCJAP00000026172	ENSCJAG00000014210	<i>ADAP2</i>	1	5:92369119-92406702	381	554	0.0	93.44
<i>ADAP1</i>		ENSCJAP00000048557	ENSCJAG00000015811	<i>ADAP1</i>	2	2:56955392-57014328	336	344	5,00E-126	59.52
<i>RNF135</i>		ENSCJAP00000026182	ENSCJAG00000014235	<i>RNF135</i>	3	5:92342252-92357613	435	560	0.0	85.75
<i>NF1</i>		ENSCJAP00000025805	ENSCJAG00000013924	<i>NF1</i>	6	5:93187983-93481033	2839	4293	0.0	99.68
<i>UTP6</i>		ENSCJAP00000025966	ENSCJAG00000014115	<i>UTP6</i>	1	5:92698514-92738377	597	866	0.0	95.64
<i>SUZ12</i>		ENSCJAP00000026016	ENSCJAG00000014133	<i>SUZ12</i>	1	5:92580829-92648466	658	1035	0.0	99.39
<i>OMG</i>		ENSCJAP00000025889	ENSCJAG00000014092	<i>OMG</i>	1	5:93269084-93270367	428	592	0.0	97.90
<i>LRRC37B</i>		ENSCJAP00000044215	ENSCJAG0000001032	<i>ENSCJAG0000001032</i>	3	GL285097.1:40089-55767	886	541	0.0	53.95
		ENSCJAP00000026099	ENSCJAG00000014194	<i>ENSCJAG00000014194</i>	1	13:20088200-20090218	601	259	4,00E-86	41.26
		ENSCJAP00000023355	ENSCJAG0000001338	<i>ENSCJAG0000001338</i>	3	5:63796051-63811610	192	227	6,00E-73	71.35
<i>ENSCJAP00000032794</i>		ENSCJAG00000017781	<i>ENSCJAG00000017781</i>	1	5:38440670-38443673	523	209	4,00E-66	41.30	
<i>EVI2A</i>		ENSCJAP00000025894	ENSCJAG00000014096	<i>ENSCJAG00000014096</i>	1	5:93241274-93243377	256	365	3,00E-136	91.02
<i>EVI2B</i>		ENSCJAP00000046393	ENSCJAG00000014095	<i>EVI2B</i>	2	5:93256893-93258209	439	536	0.0	87.70
<i>RAB11FIP4/RAB11FIP3</i>		EH24670	ENSCJAG00000014099	<i>RAB11FIP4</i>	2	5:93032462-93130647	-	1065	0.0	99.00
<i>TEFM</i>	ENSCJAP00000026127	ENSCJAG00000014201	<i>TEFM</i>	1	5:92423632-92429548	356	481	0.0	87.64	
<i>COPRS</i>	ENSCJAP00000051487	ENSCJAG00000014110	<i>COPRS</i>	3	5:92744895-92754415	172	253	2,00E-91	87.79	
Cachorro (Canis lupus familiaris - Clu) 78 cromossomos (38+X)	<i>CRLF3</i>	ENSCAF00000027303	ENSCAF00000018492	<i>CRLF3</i>	1	9:40933460-40976601	438	643	0.0	96.35
	<i>ATAD5</i>	ENSCAF00000027299	ENSCAF00000018481	<i>ATAD5</i>	2	9:40870927-40917915	1910	1973	0.0	76.70
	<i>ADAP2/ADAP1</i>	ENSCAF00000030645	ENSCAF00000018466	<i>ADAP2</i>	1	9:40819428-40845115	381	532	0.0	89.24
	<i>ADAP1</i>	ENSCAF00000016695	ENSCAF00000011344	<i>ADAP1</i>	1	6:15921974-15973509	347	359	2,00E-132	61.38
	<i>RNF135</i>	ENSCAF00000027261	ENSCAF00000018462	<i>RNF135</i>	1	9:40795300-40808721	438	398	1,00E-147	61.87
	<i>NF1</i>	ENSCAF00000027461	ENSCAF00000018592	<i>NF1</i>	2	9:41470995-41679382	2821	4225	0.0	98.51
	<i>UTP6</i>	ENSCAF00000027330	ENSCAF00000018507	<i>UTP6</i>	1	9:41067262-41093010	598	809	0.0	89.46
	<i>SUZ12</i>	ENSCAF00000027313	ENSCAF00000018498	<i>SUZ12</i>	1	9:40994870-41038250	650	1020	0.0	99.23
	<i>OMG</i>	ENSCAF00000027481	ENSCAF00000018624	<i>OMG</i>	1	9:41546736-41548019	428	583	0.0	96.26
	<i>LRRC37B</i>	ENSCAF00000041156	ENSCAF00000031375	<i>ENSCAF00000031375</i>	1	9:17979631-17995435	655	286	1,00E-93	38.47
		ENSCAF00000037618	ENSCAF00000029478	<i>ENSCAF00000029478</i>	1	9:10291948-10304722	628	246	6,00E-75	36.31
		ENSCAF00000043093	ENSCAF00000031467	<i>ENSCAF00000031467</i>	1	14:22322624-22332292	605	158	2,00E-44	30.58
	<i>EVI2A</i>	ENSCAF00000036800	ENSCAF00000029405	<i>ENSCAF00000029405</i>	1	9:41523246-41523938	231	260	1,00E-93	74.03
	<i>EVI2B</i>	ENSCAF00000027479	ENSCAF00000018623	<i>EVI2B</i>	1	9:41535738-41537066	444	447	2,00E-167	72.52
	<i>RAB11FIP4/RAB11FIP3</i>	ENSCAF00000027341	ENSCAF00000018522	<i>RAB11FIP4</i>	1	9:41342258-41416095	557	719	0.0	94.25
	<i>TEFM</i>	ENSCAF00000029106	ENSCAF00000019670	<i>RAB11FIP3</i>	1	6:40022000-40044261	495	289	2,00E-101	46.06
<i>TEFM</i>	ENSCAF00000042698	ENSCAF00000018475	<i>TEFM</i>	2	9:40860963-40867816	360	429	2,00E-161	76.11	
<i>COPRS</i>	ENSCAF00000027336	ENSCAF00000018517	<i>COPRS</i>	1	9:41100041-41103771	136	192	9,00E-67	81.62	

Gorila (Gorilla gorilla gorilla - Ggo) 46 cromossomos (22+X) (cromossomo 2 dividido em 2a e 2b)	CRLF3	ENSGGOP0000004903	ENSGGOG0000005002	CRLF3	1	5:53436428-53476145	444	664	0.0	99.55
	ATAD5	ENSGGOP0000005765	ENSGGOG0000005883	ATAD5	1	5:53366215-53428754	1844	2363	0.0	93.71
	ADAP2/ ADAP1	ENSGGOP00000028548	ENSGGOG0000004257	ADAP2	2	5:53303421-53338277	379	539	0.0	92.35
	RNF135	ENSGGOP0000005786	ENSGGOG0000005912	RNF135	1	7:836349-892450	347	343	8,00E-126	57.93
	NF1	ENSGGOP0000006859	ENSGGOG0000006983	NF1	2	5:52834636-53161679	2839	4209	0.0	98.20
	UTP6	ENSGGOP00000028108	ENSGGOG00000026003	ENSGGOG00000026003	2	15:30768738-30770828	598	671	0.0	78.76
		ENSGGOP00000013242	ENSGGOG00000013569	UTP6	1	5:52298783-52338080	597	611	0.0	74.20
	SLZ12	ENSGGOP00000010105	ENSGGOG00000010352	SLZ12	1	5:52191094-52251152	583	920	0.0	99.66
	OMG	-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
	LRRC37B	ENSGGOP00000024608	ENSGGOG00000012882	ENSGGOG00000012882	2	10:30462810-30468162	915	977	0.0	79.89
		ENSGGOP00000028210	ENSGGOG00000026947	ENSGGOG00000026947	1	5:52148708-52163228	707	784	0.0	83.88
		ENSGGOP00000024093	ENSGGOG00000025742	ENSGGOG00000025742	1	5:53207699-53219434	678	413	6,00E-147	51.62
		ENSGGOP00000027053	ENSGGOG00000024250	ENSGGOG00000024250	1	5:45127944-45141094	516	354	1,00E-122	53.10
	EVI2A	ENSGGOP00000025097	ENSGGOG00000024807	ENSGGOG00000024807	2	5:52889964-52892080	259	399	9,00E-151	98.46
	EVI2B	ENSGGOP0000005071	ENSGGOG0000005182	EVI2B	1	5:52905461-52906765	435	614	0.0	97.93
	RAB11FIP4/ RAB11FIP3	ENSGGOP0000001056	ENSGGOG0000001071	RAB11FIP4	1	5:52672926-52816615	624	869	0.0	99.68
TEFM	ENSGGOP00000020628	ENSGGOG00000025274	TEFM	1	5:53354081-53361907	360	554	0.0	99.44	
COPRS	ENSGGOP00000007136	ENSGGOG00000007292	COPRS	2	5:52342244-52349288	186	281	4,00E-103	97.31	
Humano (homo sapiens - Hsa) 48 cromossomos (46+X+Y)	CRLF3	ENSP00000318804	ENSG00000176390	CRLF3	1	17:30784190-30824651	442	667	0.0	100.00
	ATAD5	ENSP00000313171	ENSG00000176208	ATAD5	2	17:30832348-30894910	1844	2574	0.0	100.00
	ADAP2/ ADAP1	ENSP00000329468	ENSG00000184060	ADAP2	6	17:30922015-30957866	381	591	0.0	100.00
	RNF135	ENSP00000328340	ENSG00000181481	RNF135	5	17:30971074-30999188	432	655	0.0	100.00
	NF1	ENSP00000351015	ENSG00000196712	NF1	7	17:31095310-31374152	2839	4302	0.0	100.00
	UTP6	ENSP00000261708	ENSG00000108651	UTP6	1	17:31863362-31901627	597	908	0.0	100.00
	SLZ12	ENSP00000316578	ENSG00000178691	SLZ12	2	17:31937448-31998958	658	1040	0.0	100.00
	OMG	ENSP00000247271	ENSG00000126861	OMG	1	17:31295048-31296331	428	609	0.0	100.00
	LRRC37B	ENSP00000378202	ENSG00000185158	LRRC37B	9	17:32021147-32053325	947	1295	0.0	100.00
	EVI2A	ENSP00000247270	ENSG00000126860	EVI2A	5	17:31318306-31320431	259	404	2,00E-152	100.00
	EVI2B	ENSP00000462682	ENSG00000185862	EVI2B	2	17:31304305-31305609	435	625	0.0	100.00
	RAB11FIP4/ RAB11FIP3	ENSP00000482620	ENSG00000131242	RAB11FIP4	4	17:31391892-31531729	624	870	0.0	100.00
	TEFM	ENSP00000399644	ENSG00000090565	RAB11FIP3	6	16:426622-520836	637	324	5,00E-114	42.07
	COPRS	ENSP00000304327	ENSG00000172301	TEFM	3	17:30899172-30906198	360	557	0.0	100.00
Macaco (Macaca mulatta - Mmu) 42 cromossomos (20+X)	CRLF3	ENSMMJUP00000011900	ENSMMJUG00000009069	CRLF3	1	16:27225529-27279056	444	661	0.0	99.10
	ATAD5	ENSMMJUP00000021240	ENSMMJUG00000016154	ENSMMJUG00000016154	1	6:96081251-96082594	438	420	4,00E-157	68.49
		-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
	ADAP2/ ADAP1	ENSMMJUP00000011908	ENSMMJUG00000009077	ADAP2	1	16:27378497-27417323	381	572	0.0	96.06
	RNF135	ENSMMJUP00000022462	ENSMMJUG00000017064	ADAP1	1	3:38827703-38885923	347	357	1,00E-131	59.37
	NF1	ENSMMJUP00000010452	ENSMMJUG00000007967	RNF135	1	16:27434352-27446835	175	214	1,00E-73	86.86
	UTP6	EHH24669	ENSMMJUG00000008605	NF1	3	16:26262569-26548979	-	5772	0.0	99.00
	SLZ12	ENSMMJUP00000026846	ENSMMJUG00000020403	UTP6	2	16:27056346-27097385	598	881	0.0	97.49
	OMG	EHH24673	ENSMMJUG00000001116	SLZ12	1	16:27140703-27206381	-	1374	0.0	99.00
	LRRC37B	ENSMMJUP00000008966	ENSMMJUG00000006824	OMG	1	16:26468665-26469948	428	594	0.0	98.36
		ENSMMJUP00000024288	ENSMMJUG00000018463	ENSMMJUG00000018463	3	16:56955303-56992180	908	975	0.0	77.75
		ENSMMJUP00000015398	ENSMMJUG00000011880	ENSMMJUG00000011880	5	16:57039966-57077828	577	622	0.0	79.90
		ENSMMJUP00000004409	ENSMMJUG00000003308	ENSMMJUG00000003308	2	16:55751910-55764041	216	288	2,00E-97	83.33
	EVI2A	ENSMMJUP00000004282	ENSMMJUG00000011737	ENSMMJUG00000011737	2	16:54000170-54002322	560	273	9,00E-91	47.50
	EVI2B	ENSMMJUP00000035028	ENSMMJUG00000008604	ENSMMJUG00000008604	2	16:26495866-26497991	259	387	9,00E-146	94.98
	RAB11FIP4/ RAB11FIP3	ENSMMJUP00000011283	ENSMMJUG00000008603	EVI2B	1	16:26481610-26482923	438	566	0.0	90.64
TEFM	ENSMMJUP00000010642	ENSMMJUG00000008127	RAB11FIP4	2	16:26609307-26711478	557	760	0.0	99.46	
COPRS	ENSMMJUP0000000825	ENSMMJUG00000000613	RAB11FIP3	1	20:404896-503277	631	289	3,00E-100	39.78	
COPRS	ENSMMJUP00000011905	ENSMMJUG00000009073	TEFM	1	16:27355262-27361704	361	519	0.0	93.63	
	ENSMMJUP00000026842	ENSMMJUG00000020401	COPRS	2	16:27044073-27051326	172	273	8,00E-100	94.19	

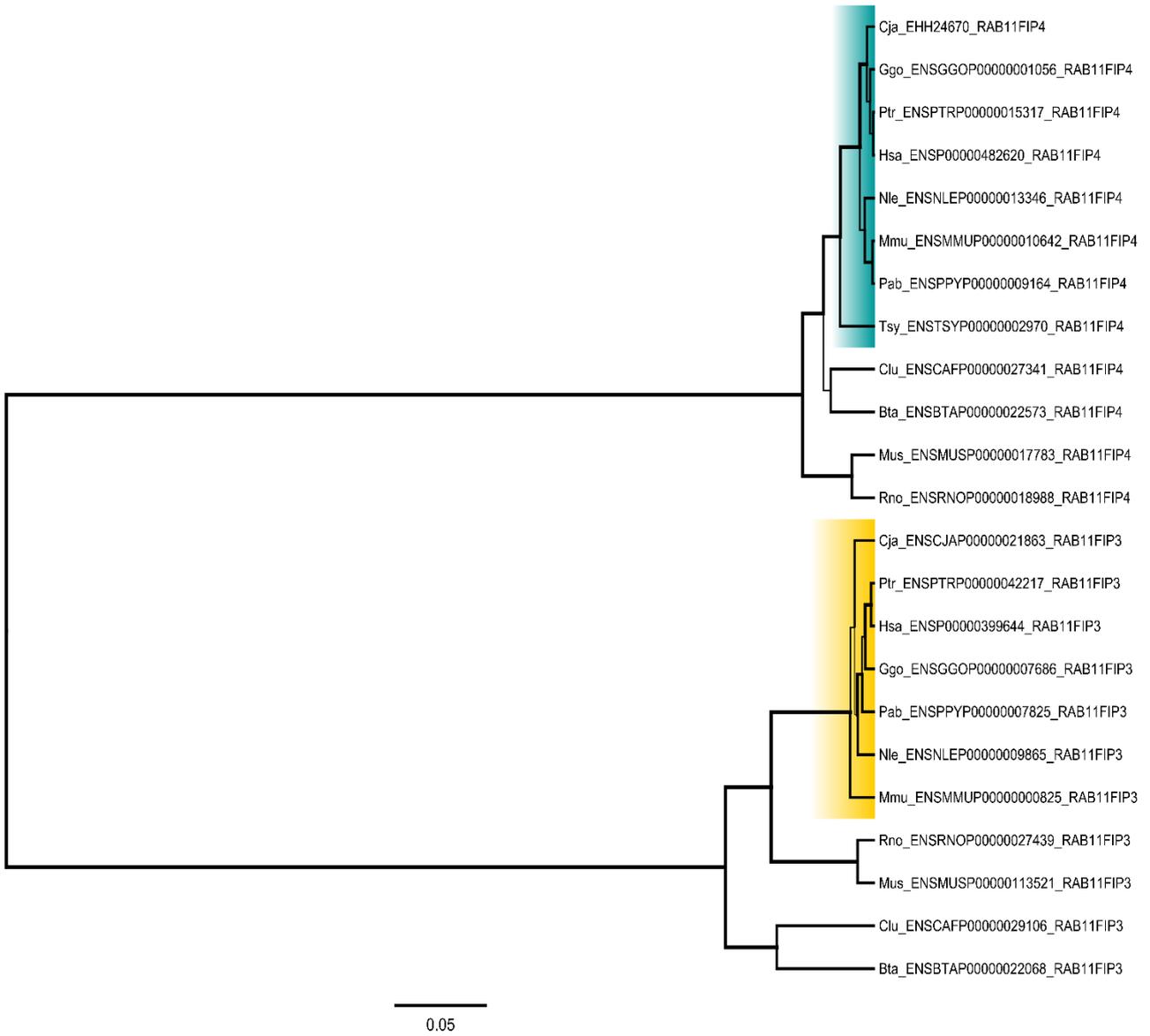
Camundongo (Mus musculus - Mus) 42 cromossomos (19+X+Y)	CRLF3	ENSMUSP00000060028	ENSMUSG00000017561	<i>Crlf3</i>	3	11:80047484-80080912	442	631	0.0	92.99
	ATAD5	ENSMUSP00000103874	ENSMUSG00000017550	<i>Atad5</i>	2	11:80089771-80134368	1852	1670	0.0	67.82
	ADAP2/	ENSMUSP00000021050	ENSMUSG00000020709	<i>Adap2</i>	2	11:80154216-80178415	377	514	0.0	85.41
	ADAP1	ENSMUSP00000106489	ENSMUSG00000056413	<i>Adap1</i>	1	5:139273348-139325314	347	360	1,00E-132	60.52
	RNF135	ENSMUSP00000017839	ENSMUSG00000020707	<i>Rnf135</i>	1	11:80183917-80199084	435	369	1,00E-135	57.70
	NF1	ENSMUSP00000071289	ENSMUSG00000020716	<i>Nf1</i>	3	11:79340000-79578393	2841	4247	0.0	98.42
	UTP6	ENSMUSP00000046643	ENSMUSG00000035575	<i>Utp6</i>	2	11:79935958-79962309	597	785	0.0	86.10
	SUZ12	ENSMUSP00000017692	ENSMUSG00000017548	<i>Suz12</i>	2	11:79993527-80032145	658	1021	0.0	97.87
	OMG	ENSMUSP00000132918	ENSMUSG00000049612	<i>Omg</i>	1	11:79501741-79503021	427	542	0.0	89.23
	LRRC37B	ENSMUSP00000129662	ENSMUSG00000034239	<i>Gm884</i>	2	11:103543324-103614303	773	329	2,00E-109	38.29
	EVI2A	ENSMUSP00000125936	ENSMUSG00000078771	<i>Evi2a</i>	2	11:79527117-79527782	228	210	6,00E-73	64.04
	EVI2B	ENSMUSP00000128569	ENSMUSG00000070354	<i>Evi2b</i>	1	11:79515470-79516747	442	307	7,00E-110	53.39
	RAB11FIP4/	ENSMUSP00000017783	ENSMUSG00000017639	<i>Rab11fip4</i>	2	11:79591315-79692836	625	793	0.0	92.64
	RAB11FIP3	ENSMUSP00000113521	ENSMUSG00000037098	<i>Rab11fip3</i>	4	17:25990775-26067680	625	331	2,00E-114	42.72
TEFM	ENSMUSP00000059304	ENSMUSG00000046909	<i>Tefm</i>	2	11:80136848-80142077	352	361	2,00E-133	67.90	
COPRS	ENSMUSP00000033839	ENSMUSG00000031458	<i>Coprs</i>	1	8:13885035-13890211	169	204	1,00E-71	75.74	
Gibão de bochechas brancas (Nomascus leucogenys - Nle) 38-52 cromossomos	CRLF3	ENSNLEP00000007078	ENSNLEG00000005850	<i>CRLF3</i>	1	GL397459.1:20198-59621	354	558	0.0	100.00
	ATAD5	ENSNLEP00000007107	ENSNLEG00000005853	<i>ATAD5</i>	1	GL397459.1:87678-148528	1844	2474	0.0	96.31
	ADAP2/	ENSNLEP00000007119	ENSNLEG00000005879	<i>ADAP2</i>	1	GL397459.1:175902-202784	390	509	0.0	88.21
	ADAP1	ENSNLEP00000010260	ENSNLEG00000008426	<i>ADAP1</i>	1	GL397443.1:435701-493496	347	322	1,00E-117	55.33
	RNF135	-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
	NF1	ENSNLEP00000013316	ENSNLEG00000010582	<i>NF1</i>	1	GL397485.1:116905-400800	2839	4277	0.0	99.08
	UTP6	ENSNLEP00000013490	ENSNLEG00000011009	<i>UTP6</i>	1	GL397485.1:907327-950700	597	875	0.0	97.15
	SUZ12	ENSNLEP00000013539	ENSNLEG00000011117	<i>SUZ12</i>	1	GL397485.1:982109-1055613	658	1035	0.0	99.54
	OMG	ENSNLEP00000013331	ENSNLEG00000010979	<i>OMG</i>	1	GL397485.1:322932-324215	428	598	0.0	98.13
	LRRC37B	ENSNLEP00000013553	ENSNLEG00000011154	<i>LRRC37B</i>	1	GL397485.1:1078267-1111947	952	1106	0.0	85.19
	EVI2A	ENSNLEP00000013338	ENSNLEG00000010986	<i>ENSNLEG00000010986</i>	1	GL397485.1:346257-348375	259	384	2,00E-144	94.98
	EVI2B	ENSNLEP00000013335	ENSNLEG00000010983	<i>EVI2B</i>	1	GL397485.1:332211-333518	436	598	0.0	95.18
	RAB11FIP4/	ENSNLEP00000013346	ENSNLEG00000010989	<i>RAB11FIP4</i>	2	GL397485.1:435495-560387	622	800	0.0	92.28
	RAB11FIP3	ENSNLEP00000009865	ENSNLEG00000008080	<i>RAB11FIP3</i>	1	GL397322.1:467471-506833	544	247	3,00E-84	39.71
TEFM	ENSNLEP00000007111	ENSNLEG00000005875	<i>TEFM</i>	1	GL397459.1:152769-160546	357	536	0.0	97.20	
COPRS	ENSNLEP00000013362	ENSNLEG00000011000	<i>COPRS</i>	1	GL397485.1:894672-901060	186	273	4,00E-100	93.01	
Chimpanzé (Pan troglodytes - Ptr) 48 cromossomos (22+X)	CRLF3	ENSPTRP00000015299	ENSPTRG00000008963	<i>CRLF3</i>	1	17:26256802-26298711	442	667	0.0	100.00
	ATAD5	ENSPTRP00000015300	ENSPTRG00000008964	<i>ATAD5</i>	1	17:26180838-26248737	1844	2530	0.0	98.54
	ADAP2	ENSPTRP00000015304	ENSPTRG00000008966	<i>ADAP2</i>	1	17:26116861-26154177	381	588	0.0	99.21
	RNF135	ENSPTRP00000015306	ENSPTRG00000008967	<i>RNF135</i>	1	17:26079369-26104642	436	640	0.0	97.25
	NF1	ENSPTRP00000015312	ENSPTRG00000008970	<i>NF1</i>	1	17:25662187-25937192	2839	4301	0.0	99.96
	UTP6	ENSPTRP00000015321	ENSPTRG00000008977	<i>UTP6</i>	1	17:25103021-25138303	521	777	0.0	99.23
	SUZ12	ENSPTRP00000015327	ENSPTRG00000008980	<i>SUZ12</i>	1	17:25002473-25065788	658	1036	0.0	99.70
	OMG	ENSPTRP00000015314	ENSPTRG00000008971	<i>OMG</i>	1	17:25736434-25737717	428	609	0.0	99.77
	LRRC37B	ENSPTRP00000015328	ENSPTRG00000034311	<i>ENSPTRG00000034311</i>	1	GL392684.1:11678-26241	686	951	0.0	97.38
		ENSPTRP00000061088	ENSPTRG00000041217	<i>ENSPTRG00000041217</i>	1	10:27597821-27599852	593	531	0.0	64.59
		ENSPTRP00000015329	ENSPTRG00000009573	<i>ENSPTRG00000009573</i>	1	GL392695.1:56411-91269	772	450	2,00E-158	49.09
		ENSPTRP00000015475	ENSPTRG00000009256	<i>ENSPTRG00000009256</i>	1	GL392694.1:45520-54108	891	330	2,00E-113	39.84
	EVI2A	ENSPTRP00000058537	ENSPTRG00000008973	<i>ENSPTRG00000008973</i>	1	17:25713549-25714256	236	368	4,00E-138	99.58
	EVI2B	ENSPTRP00000015315	ENSPTRG00000008972	<i>EVI2B</i>	2	17:25727151-25728455	435	616	0.0	98.39
RAB11FIP4/	ENSPTRP00000015317	ENSPTRG00000008974	<i>RAB11FIP4</i>	1	17:25500679-25603032	584	810	0.0	100.00	
RAB11FIP3	ENSPTRP00000042217	ENSPTRG00000007543	<i>RAB11FIP3</i>	1	16:425122-523480	631	284	1,00E-97	39.46	
TEFM	ENSPTRP00000015302	ENSPTRG00000008965	<i>TEFM</i>	1	17:26169195-26176581	360	554	0.0	99.44	
COPRS	ENSPTRP00000015319	ENSPTRG00000008976	<i>COPRS</i>	2	17:25146467-25154027	186	278	4,00E-102	95.70	

Orangotango (Pongo abelii - Pab) 46 cromossomos (22+X) (cromossomo 2 dividido em 2a e 2b)	CRLF3	ENSPPY P00000009152	ENSPPY G00000008142	CRLF3	1	17:25574996-25624139	442	667	0.0	100.00
	ATAD5	-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
	ADAP2	ENSPPY P00000009156	ENSPPY G00000008144	ADAP2	1	17:25724563-25759794	355	551	0.0	96.90
	RNF135	ENSPPY P00000009157	ENSPPY G00000008145	RNF135	1	17:25772856-25796806	432	632	0.0	96.06
	NF1	ENSPPY P00000009159	ENSPPY G00000008147	NF1	1	17:25942868-26211914	2839	4293	0.0	99.86
	UTP6	ENSPPY P00000009166	ENSPPY G00000008154	UTP6	1	17:26707240-26772847	597	839	0.0	93.63
	SUZ12	ENSPPY P00000009150	ENSPPY G00000008140	SUZ12	1	17:25470328-25525254	412	649	0.0	99.51
	OMG	ENSPPY P00000009160	ENSPPY G00000008148	DKFZP459F1351	1	17:26136074-26137357	428	602	0.0	98.83
	LRRC37B	ENSPPY P00000009625	ENSPPY G00000008570	ENSPPYG00000008570	1	17:57868463-57901830	938	1136	0.0	89.77
		ENSPPY P00000002526	ENSPPY G00000002170	ENSPPYG00000002170	2	10:28292459-28297460	577	525	0.0	65.51
		ENSPPY P00000009158	ENSPPY G00000008146	LRRC37B	1	17:25886538-25894358	645	330	6,00E-115	44.50
		ENSPPY P00000009941	ENSPPY G00000008863	ENSPPYG00000008863	1	17_random:9615248-9621780	613	281	1,00E-95	42.41
		ENSPPY P00000009549	ENSPPY G00000008498	ENSPPYG00000008498	1	17:50407501-50414258	570	236	1,00E-77	41.40
	EVI2A	ENSPPY P00000009162	ENSPPY G00000008150	ENSPPYG00000008150	1	17:26159519-26160238	240	369	2,00E-138	97.92
	EVI2B	ENSPPY P00000009161	ENSPPY G00000008149	EVI2B	1	17:26145574-26146878	435	613	0.0	97.70
	RAB11FIP4/ RAB11FIP3	ENSPPY P00000009164	ENSPPY G00000008152	RAB11FIP4	1	17:26268215-26371054	557	765	0.0	99.82
	TEFM	ENSPPY P00000009154	ENSPPY G00000008143	DKFZP459N1318	1	17:25701008-25708035	360	545	0.0	97.78
COPRS	ENSPPY P00000009165	ENSPPY G00000008153	COPRS	1	17:26695971-26702840	186	278	5,00E-102	96.24	
Rato (Rattus norvegicus - Rno) 44 cromossomos (20+X+Y)	CRLF3	ENSRNOP000000067667	ENSRNOG000000050657	Crlf3	1	10:67383903-67401836	400	552	0.0	86.25
	ATAD5	ENSRNOP00000028975	ENSRNOG00000021903	Atad5	1	10:67427438-67473450	1866	1719	0.0	68.86
	ADAP2/ ADAP1	ENSRNOP000000053112	ENSRNOG000000037148	Adap2	1	10:67494984-67526423	380	468	3,00E-177	79.21
	ADAP1	ENSRNOP000000075236	ENSRNOG000000054033	Adap1	2	12:17416459-17466804	347	360	6,00E-133	60.52
	RNF135	ENSRNOP00000005428	ENSRNOG00000004093	Rhot1	1	10:67532030-67558748	434	389	5,00E-143	59.91
	NF1	ENSRNOP000000050393	ENSRNOG00000013780	Nf1	2	10:66690133-66928166	2829	4212	0.0	97.81
	UTP6	ENSRNOP00000019044	ENSRNOG00000014209	Utp6	1	10:67257161-67285617	597	753	0.0	82.91
	SUZ12	ENSRNOP000000072250	ENSRNOG000000058663	Suz12	2	10:67325545-67369623	660	862	0.0	83.64
	OMG	ENSRNOP00000018892	ENSRNOG00000014107	Omg	1	10:66846059-66847339	427	546	0.0	89.93
	LRRC37B	ENSRNOP000000042316	ENSRNOG000000042833	Gm884	1	10:91617260-91661555	271	273	4,00E-90	65.31
	EVI2A	ENSRNOP000000035290	ENSRNOG000000022764	Evi2a	1	10:66870624-66871286	227	226	5,00E-80	67.40
	EVI2B	ENSRNOP00000018898	ENSRNOG00000014125	Evi2b	1	10:66857378-66858598	440	296	6,00E-106	52.95
	RAB11FIP4/ RAB11FIP3	ENSRNOP00000018988	ENSRNOG00000014135	Rab11fip4	1	10:66942482-67047137	625	802	0.0	93.12
	RAB11FIP3	ENSRNOP000000027439	ENSRNOG000000032152	Rab11fip3	1	10:15351387-15376223	504	250	1,00E-85	41.47
	TEFM	ENSRNOP00000005325	ENSRNOG00000004000	Tefm	2	10:67476187-67478823	347	369	7,00E-137	69.16
	COPRS	ENSRNOP00000000123	ENSRNOG00000000111	Coprs	1	16:80826734-80831784	168	197	7,00E-69	73.81
	Tarsius (Tarsius syrichta - Tsy)	CRLF3	ENSTSY P00000001673	ENSTSY G00000001807	CRLF3	1	GeneScaffold_6979:1858-14059	399	509	0.0
ATAD5		ENSTSY P00000009057	ENSTSY G00000009871	ATAD5	1	GeneScaffold_6972:1092-43243	1851	1767	0.0	72.07
ADAP2		-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
RNF135		-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
NF1		ENSTSY P00000008701	ENSTSY G00000009458	NF1	1	GeneScaffold_7882:63027-162075	1583	2180	0.0	93.37
UTP6		ENSTSY P00000002073	ENSTSY G00000002202	UTP6	1	GeneScaffold_1953:5132-31359	538	513	0.0	67.10
SUZ12		ENSTSY P00000002783	ENSTSY G00000002995	SUZ12	1	GeneScaffold_7092:3386-59491	658	881	0.0	87.54
OMG		ENSTSY P00000007966	ENSTSY G00000008689	OMG	1	scaffold_36978:4578-5864	429	583	0.0	96.50
LRRC37B		-----	-----	-----	-----	-----	-	-	-	-
EVI2A		ENSTSY P00000008702	ENSTSY G00000009480	ENSTSYG00000009480	1	GeneScaffold_7882:107567-109672	264	294	1,00E-107	74.24
EVI2B		ENSTSY P00000012530	ENSTSY G00000013659	EVI2B	1	scaffold_119061:2831-3436	206	224	9,00E-77	78.16
RAB11FIP4		ENSTSY P00000002970	ENSTSY G00000003234	RAB11FIP4	1	GeneScaffold_3344:2574-13968	449	328	7,00E-118	64.14
TEFM	ENSTSY P00000009060	ENSTSY G00000009889	TEFM	1	GeneScaffold_6972:47361-52491	349	456	7,00E-173	84.24	
COPRS	ENSTSY P00000013003	ENSTSY G00000014167	COPRS	1	scaffold_107386:2964-3980	125	186	1,00E-64	83.20	

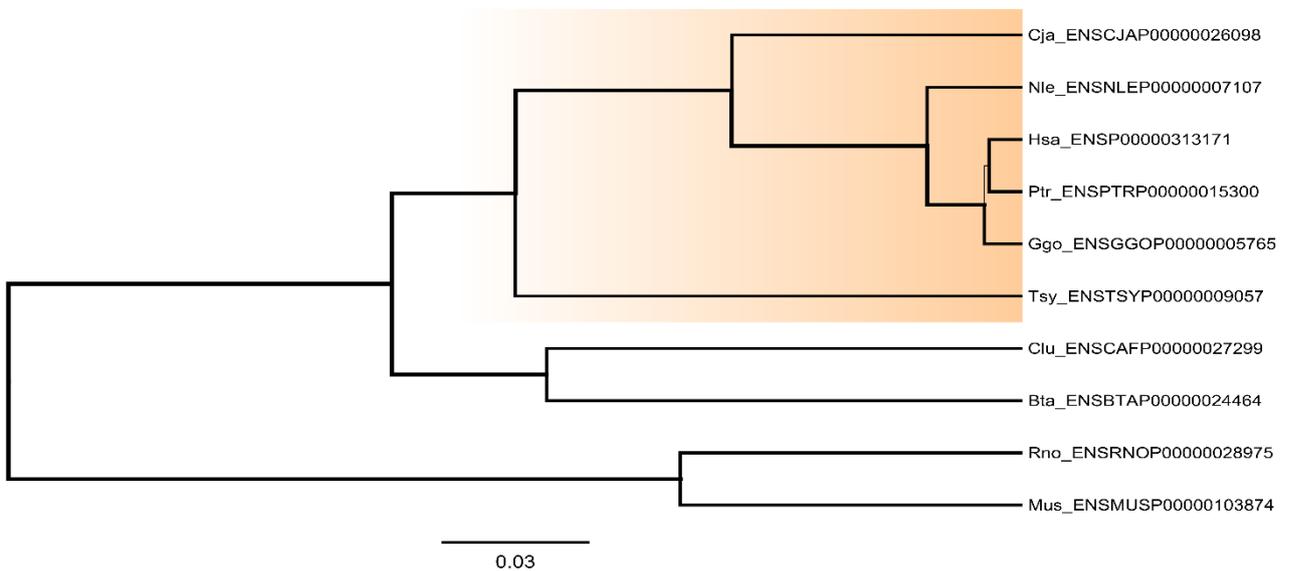
**Tabela suplementar 3:** Sítios conservados nos alinhamentos originais de cada sequência proteica.

Proteína	Total de sítios do alinhamento	Sítios conservados entre as espécies	Porcentagem de sítios conservados
CRLF3	446	348	78,0
ATAD5	1915	913	47,7
TEFM	370	184	49,7
ADAP2	402	237	59,0
ADAP1	385	277	71,9
ADAP1 e 2	414	140	33,8
RNF135	624	158	25,3
NF1	2846	2686	94,4
OMG	444	359	80,9
EVI2B	479	161	33,6
EVI2A	264	110	41,7
RAB11FP4	639	516	80,8
RAB11FP3	1096	489	44,6
RAB11FP4 e 3	1121	237	21,1
COPRS	185	96	51,9
UTP6	599	315	52,6
SUZ12	745	599	80,4
LRRC37B	4128	267	6,5

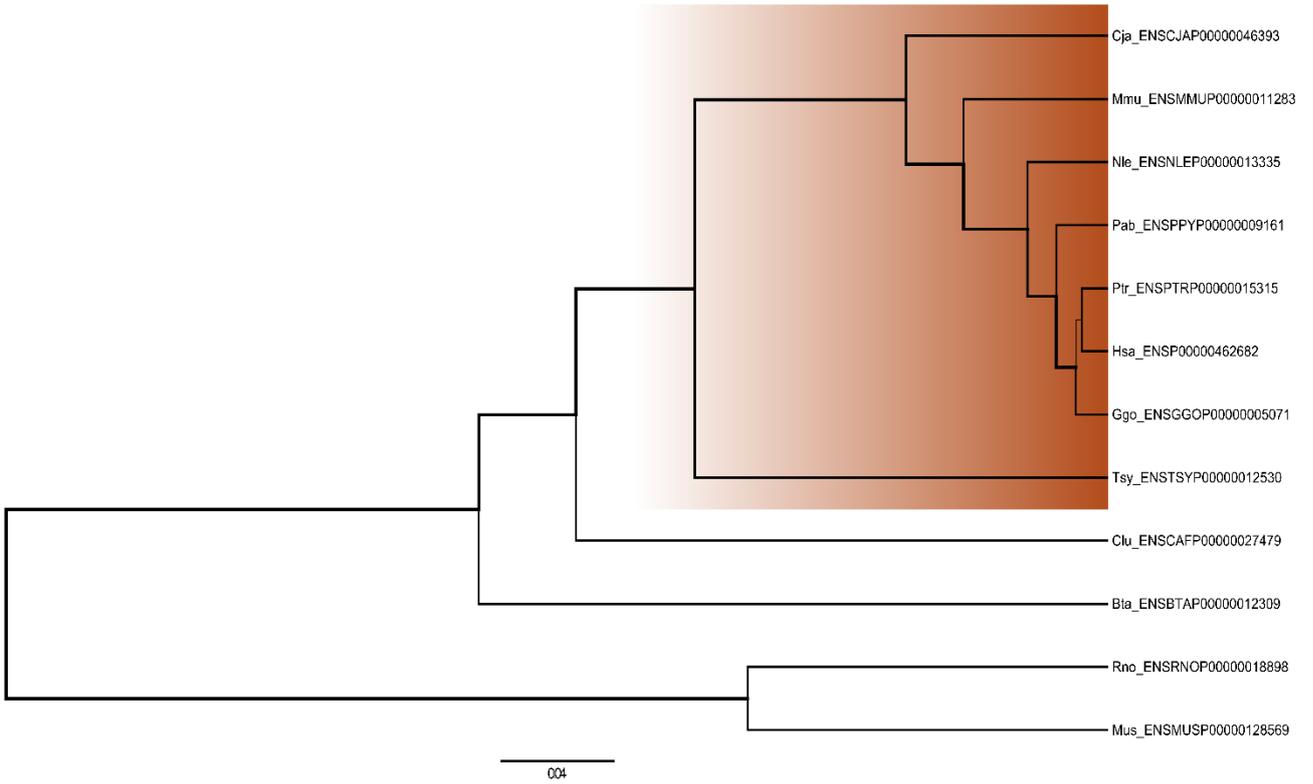
A



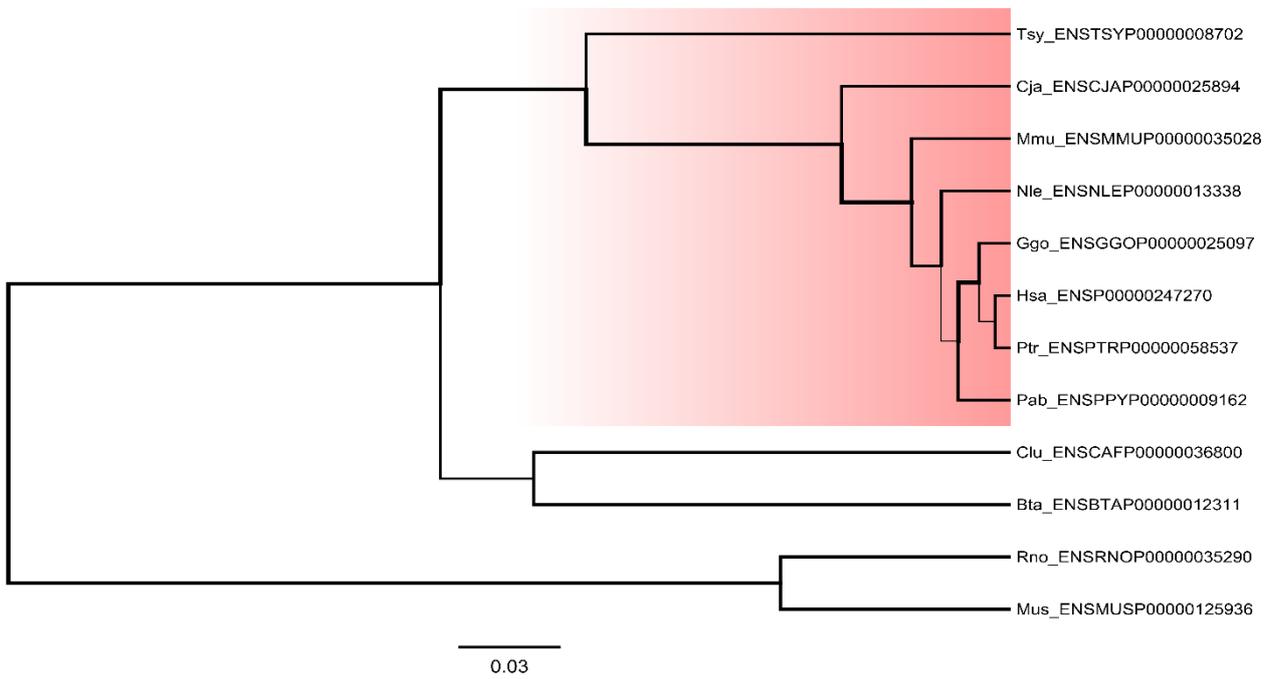
B



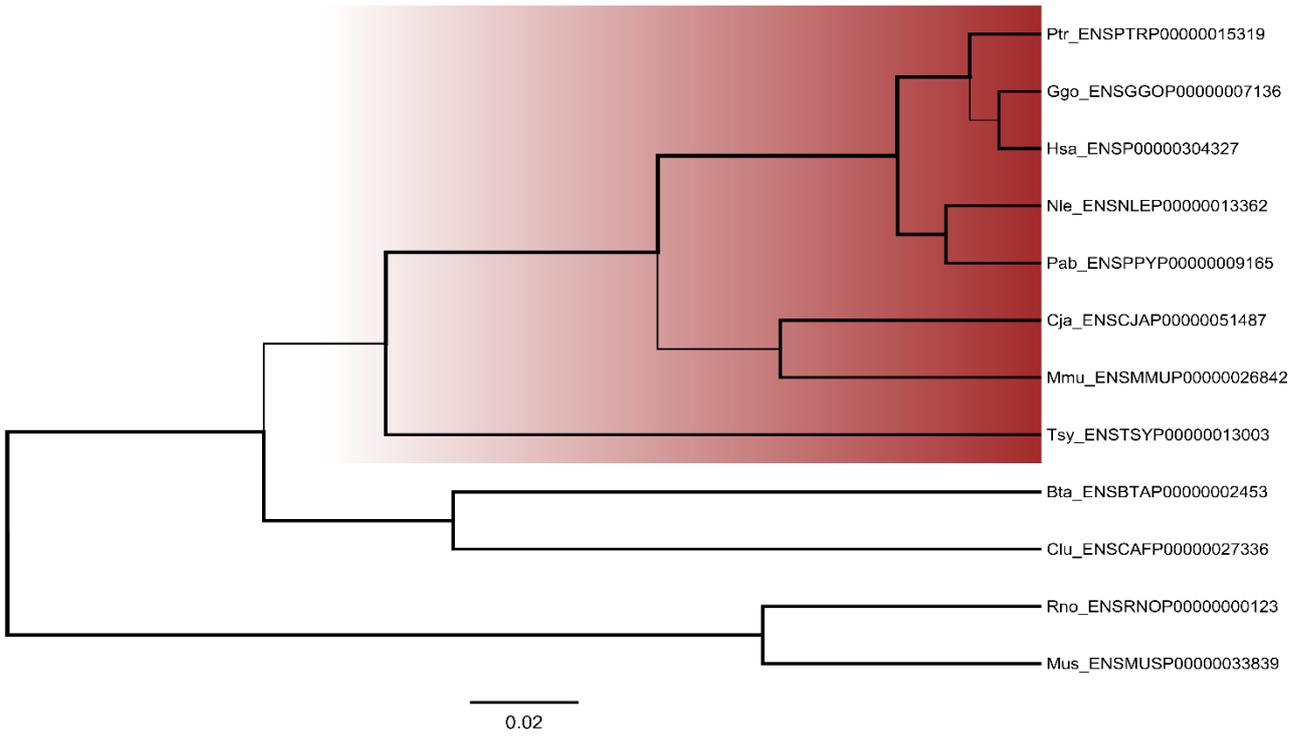
C



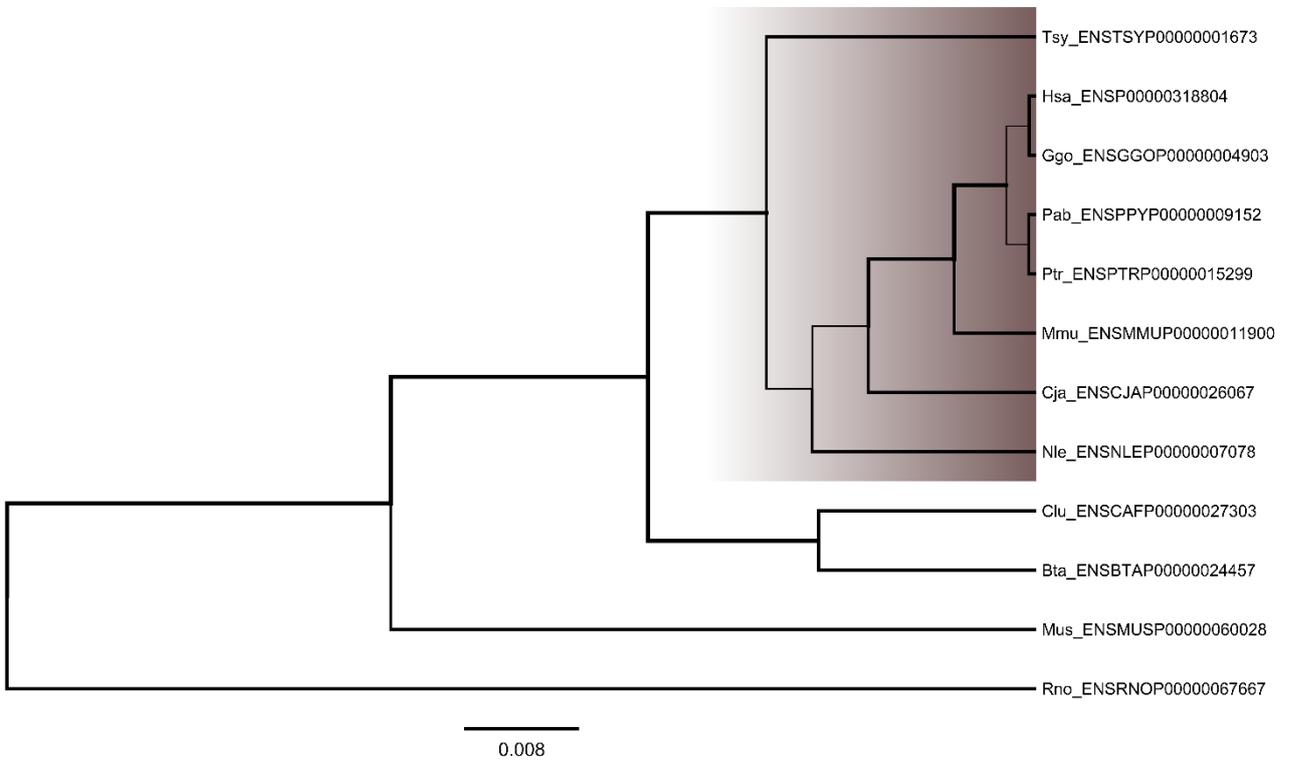
D



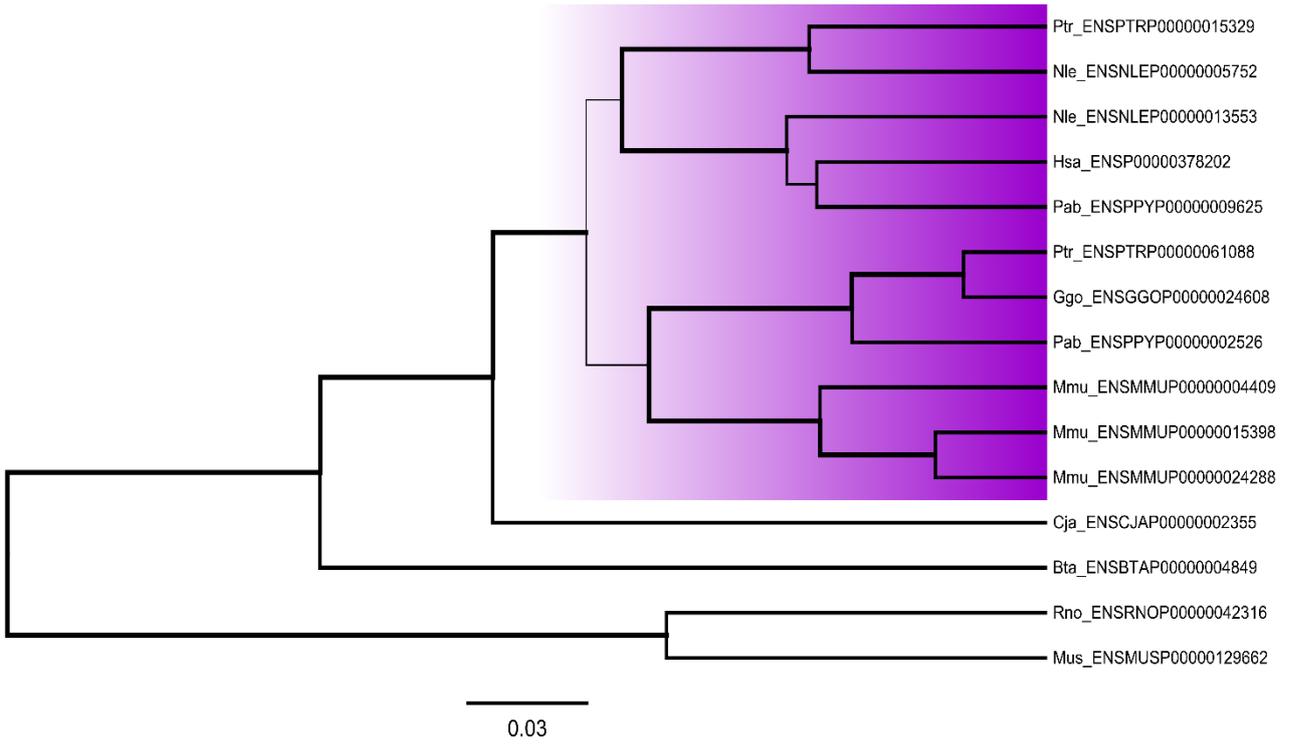
E



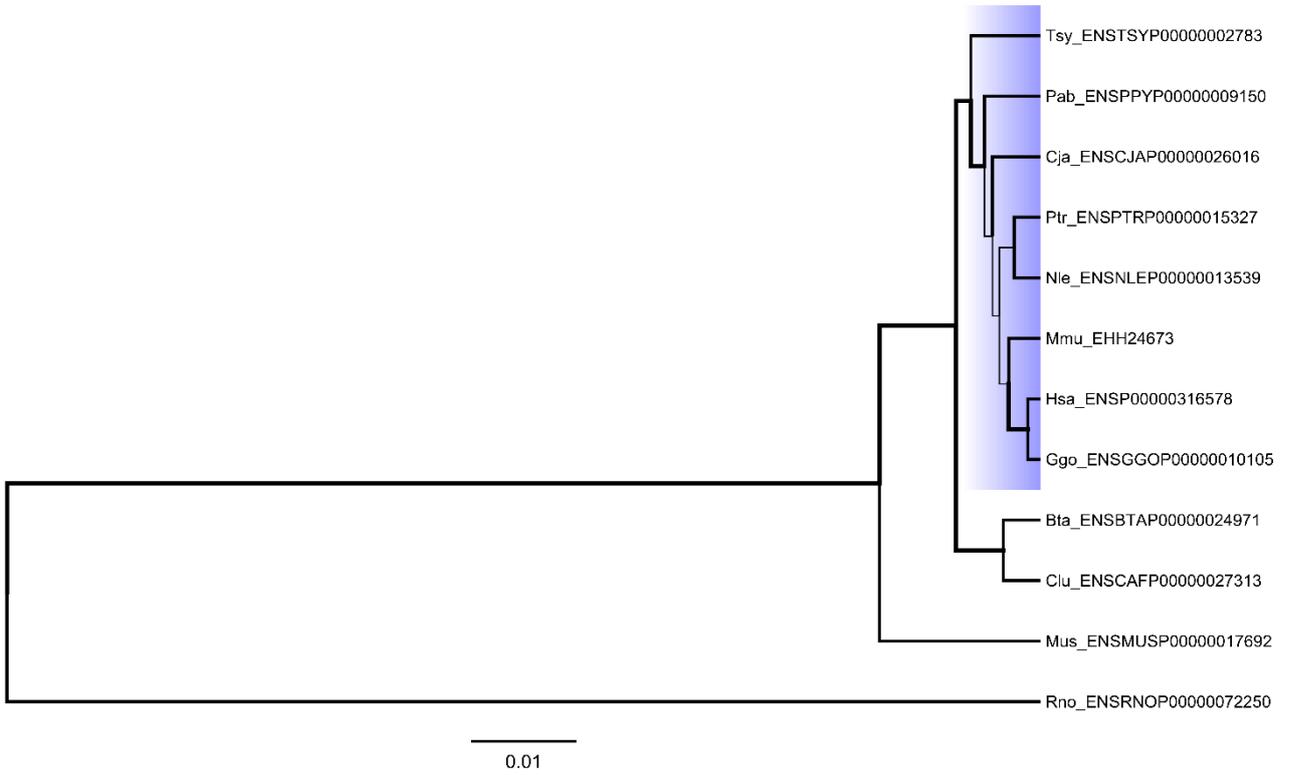
F



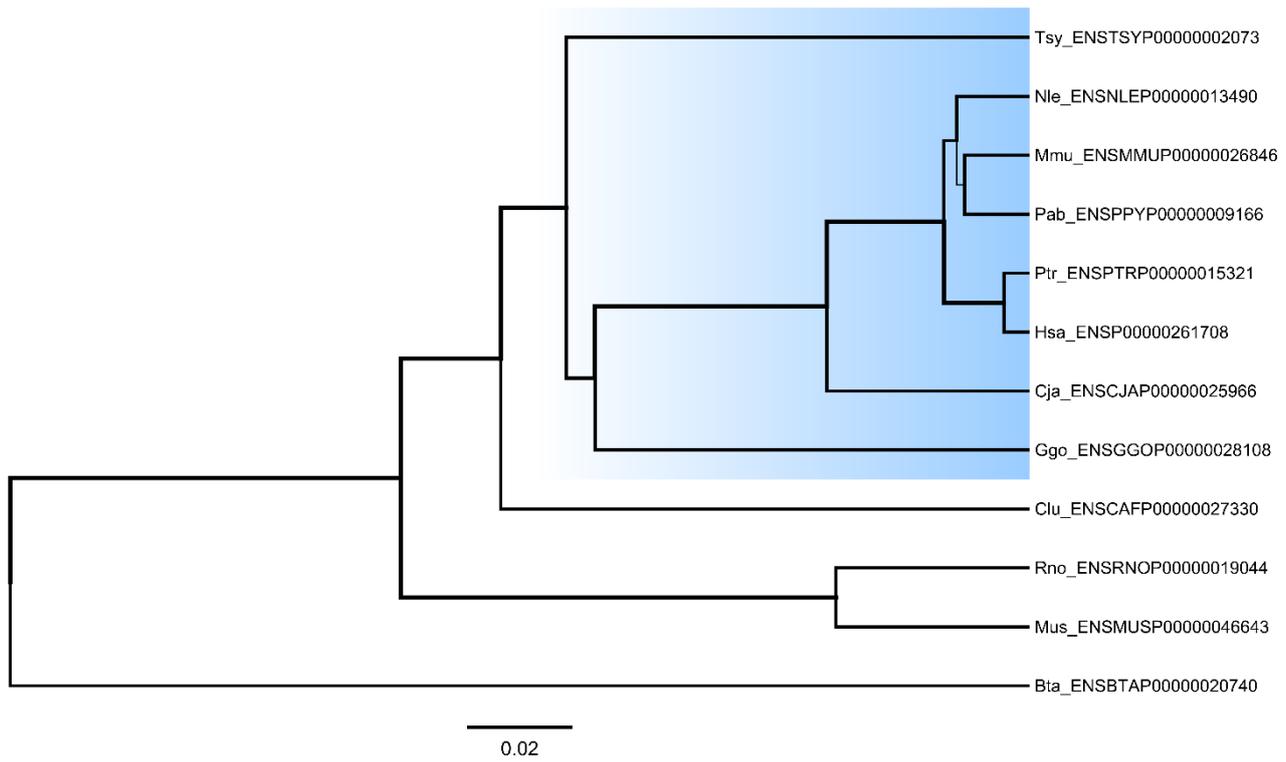
G



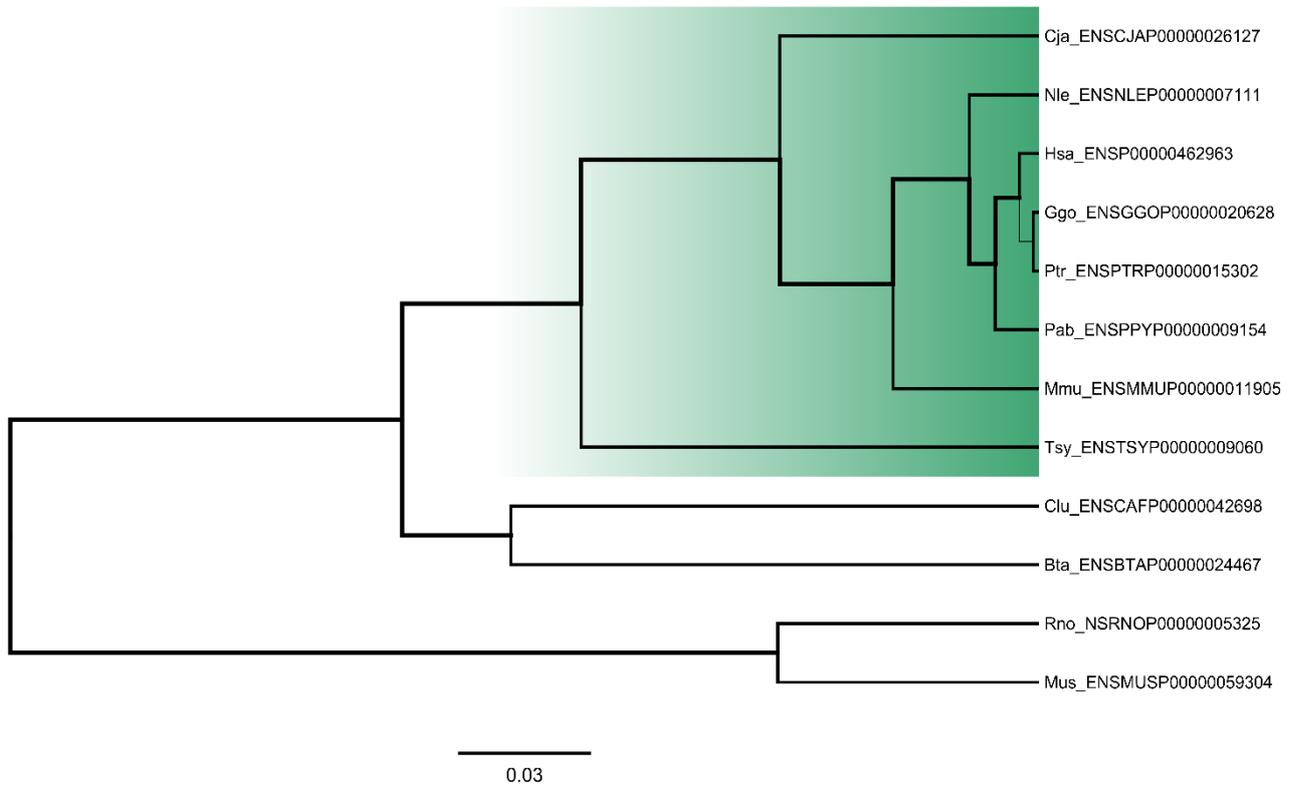
H



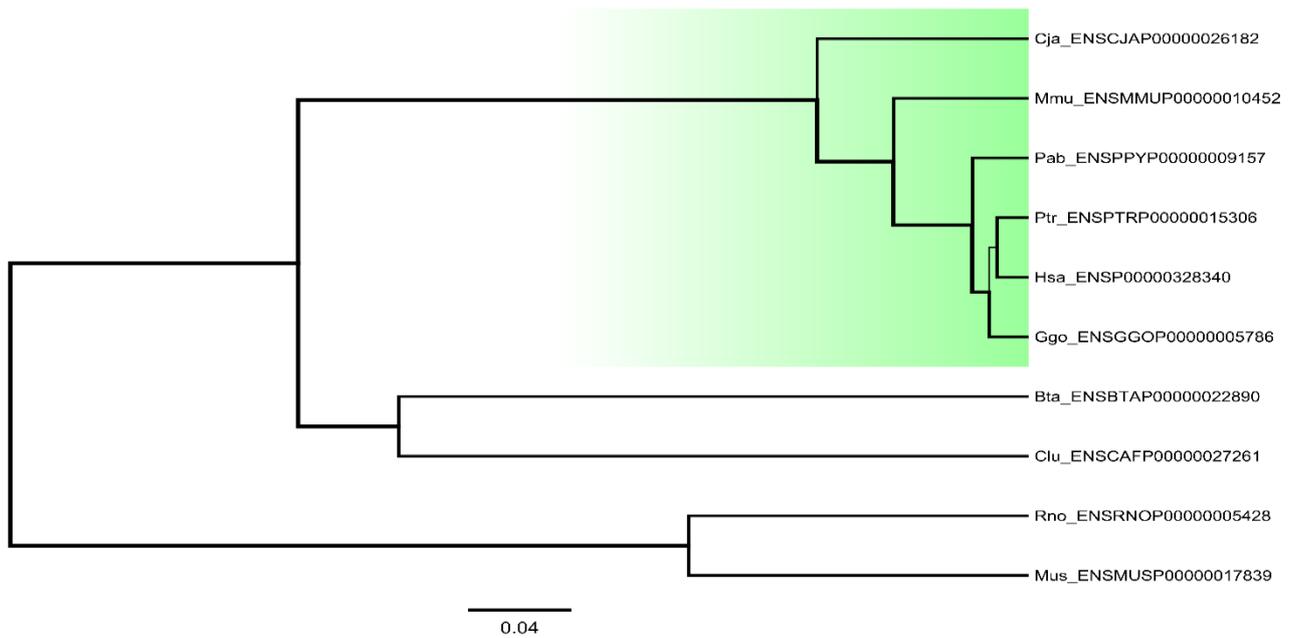
I



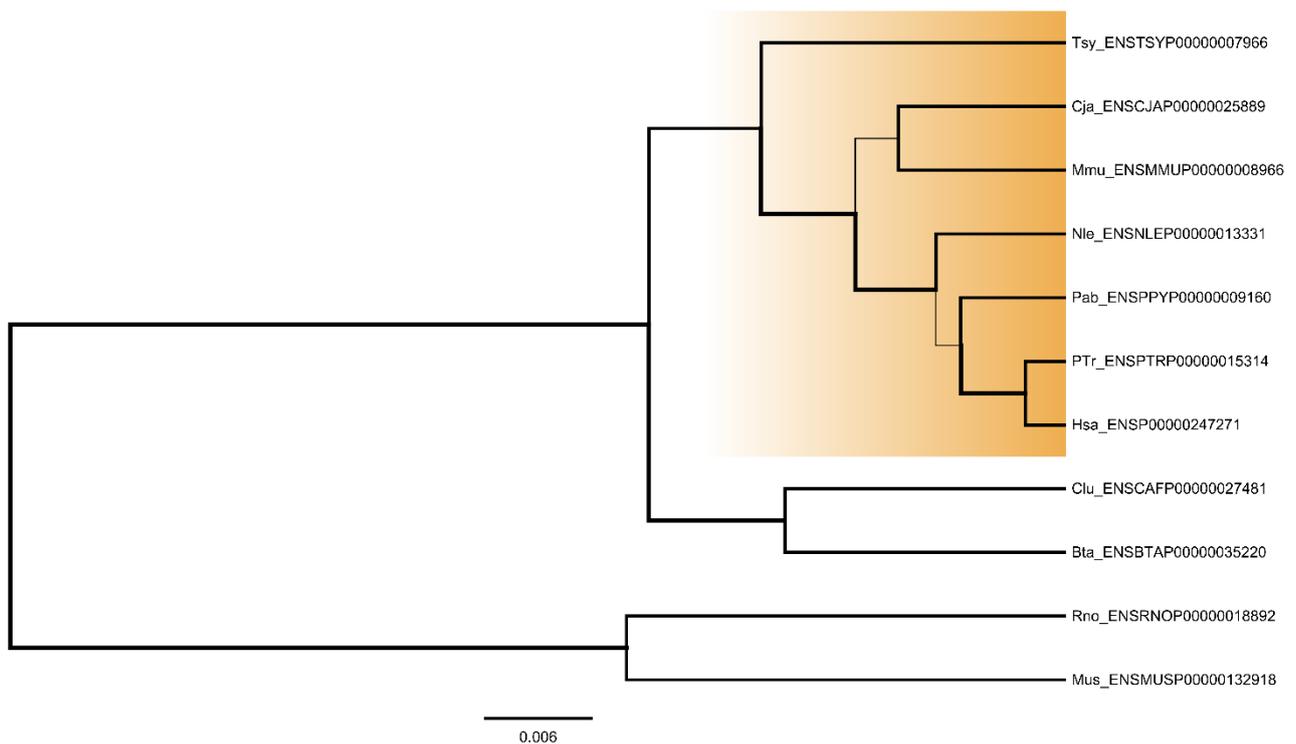
J



K

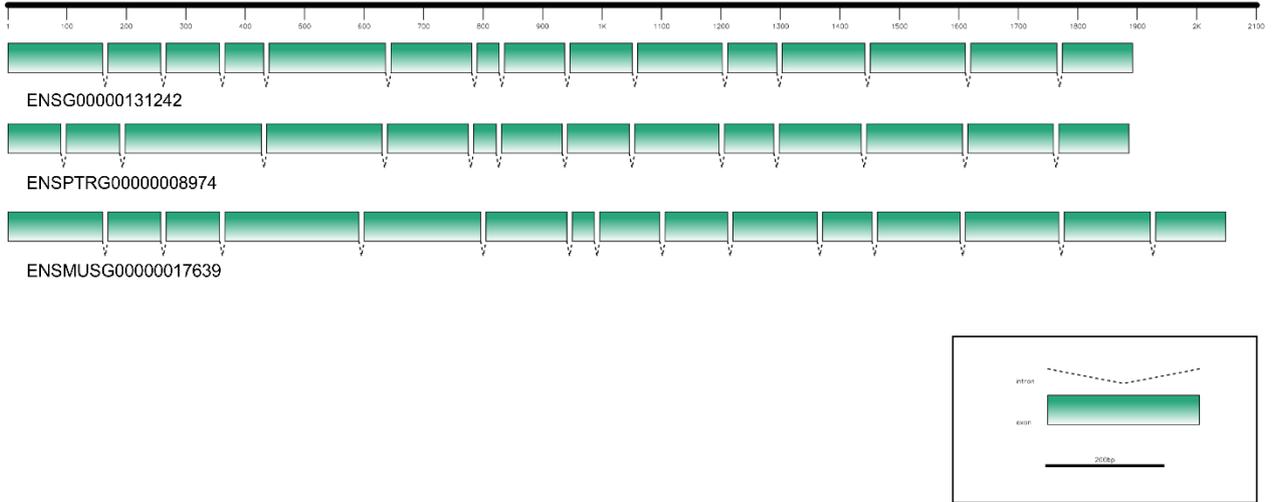


L

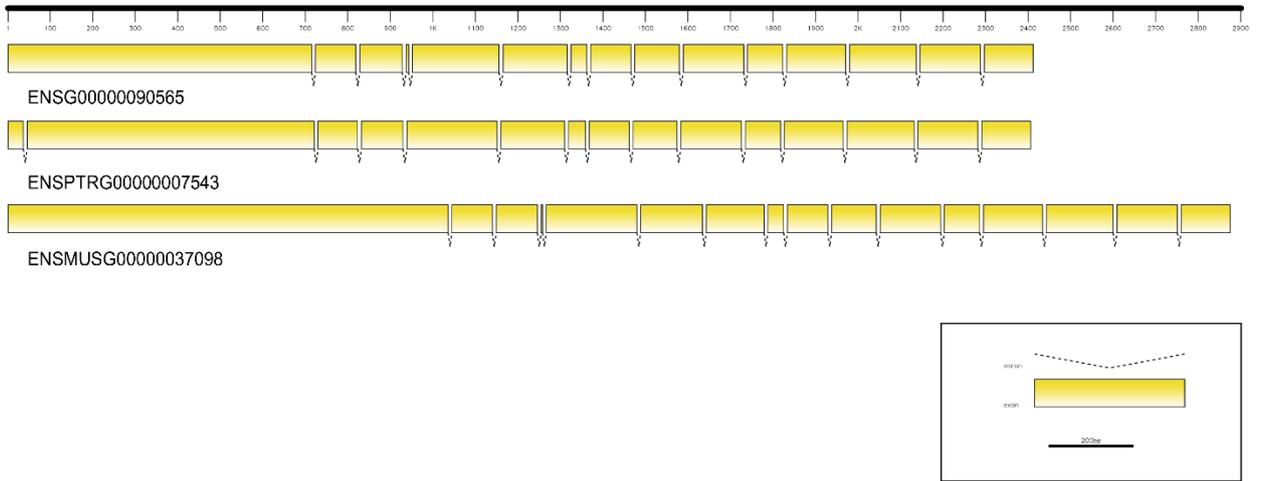


**Figura suplementar 1:** Análises filogenéticas. Filogenia dos genes **A** - *RAB11FIP4* e *RAB11FIP3*, **B** - *ATAD5*, **C** - *EVI2B*, **D** - *EVI2A*, **E** - *COPRS*, **F** - *CRLF3*, **G** - *LRRC37B*, **H** - *SUZ12*, **I** - *UTP6*, **J** - *TEFM*, **K** - *RNF135* e **L** - *OMG*. A probabilidade posterior com valores acima de 0,90, está representada pelas linhas mais espessas, enquanto que valores menores de probabilidade são retratados por linhas finas.

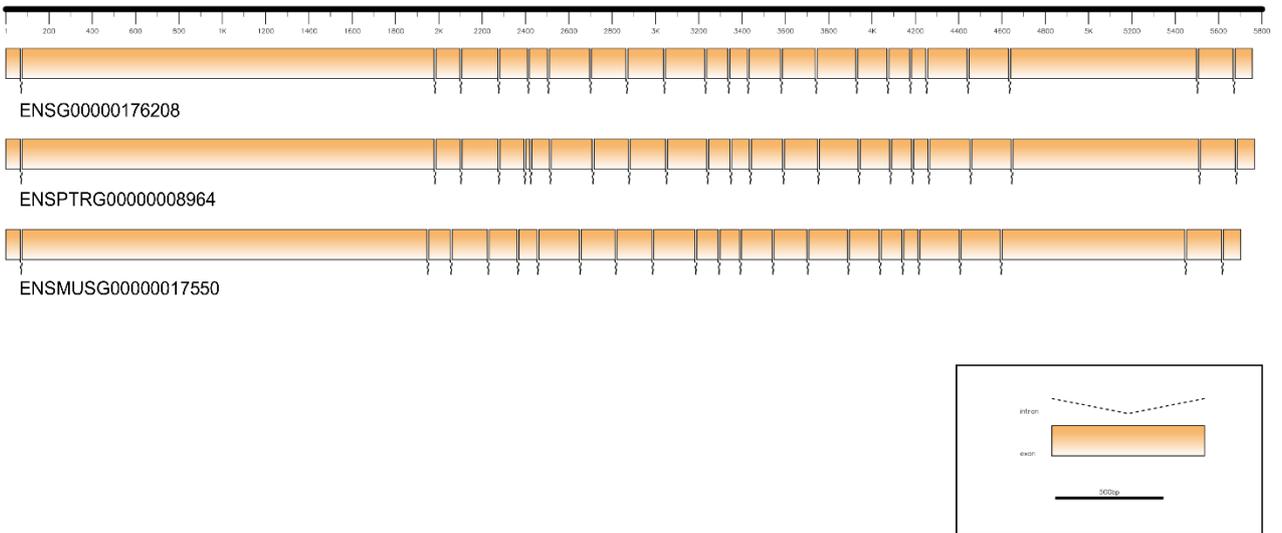
A



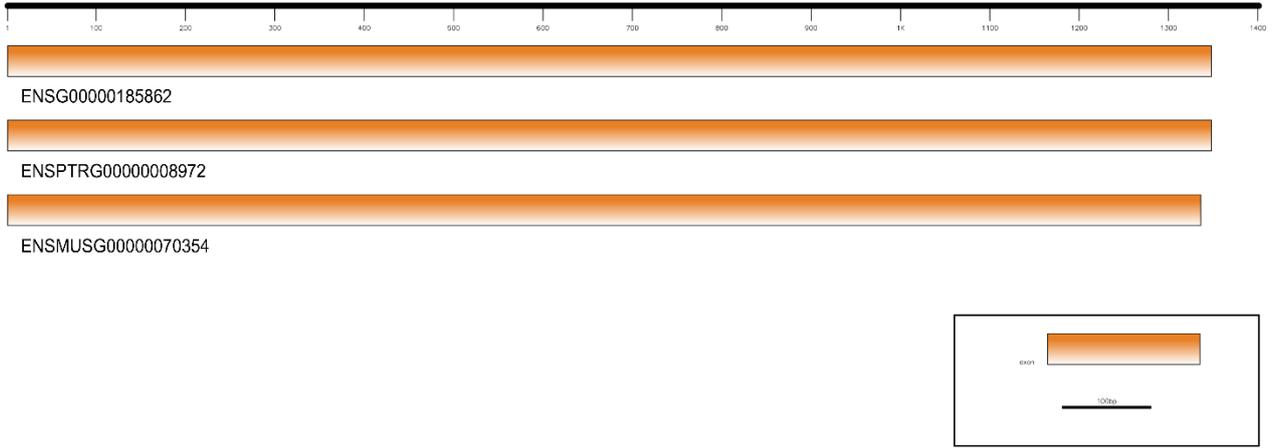
B



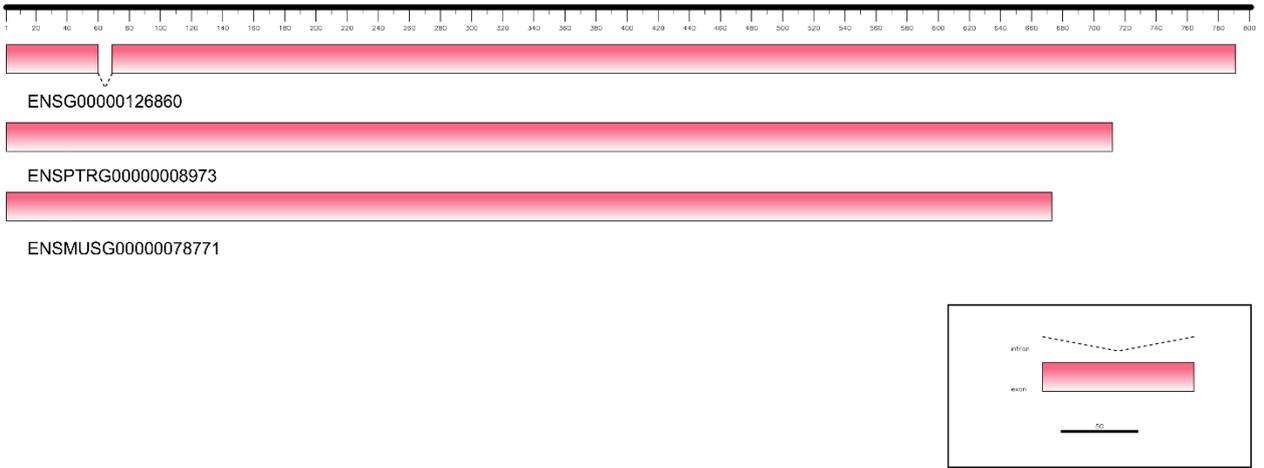
C



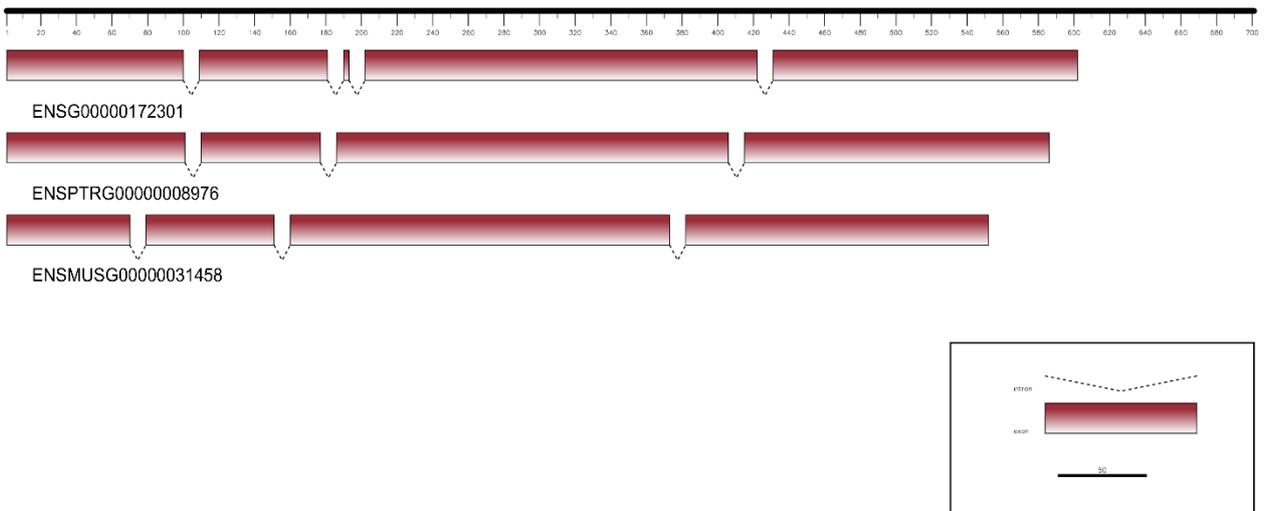
D



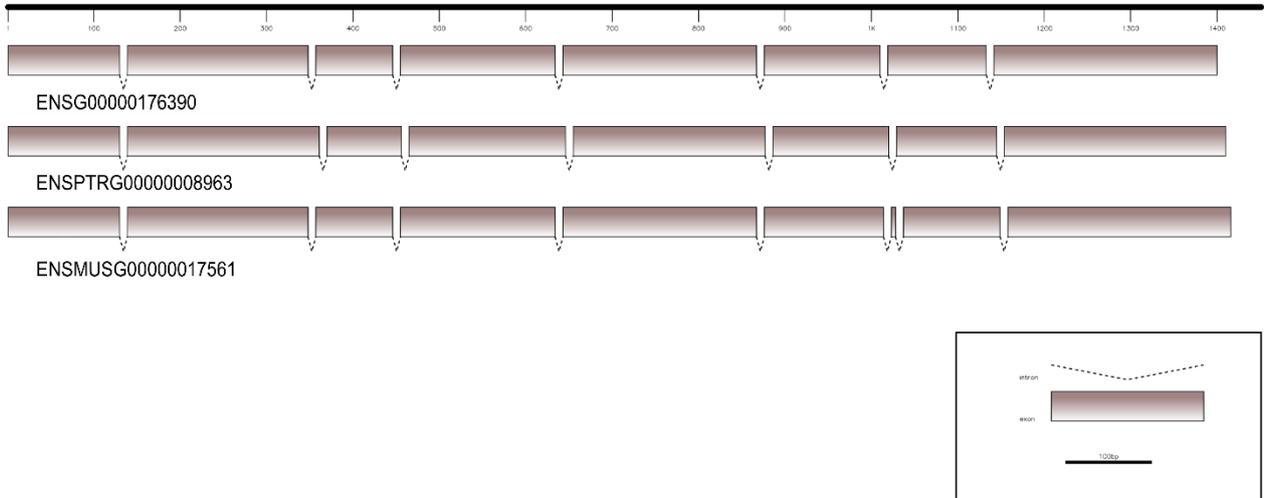
E



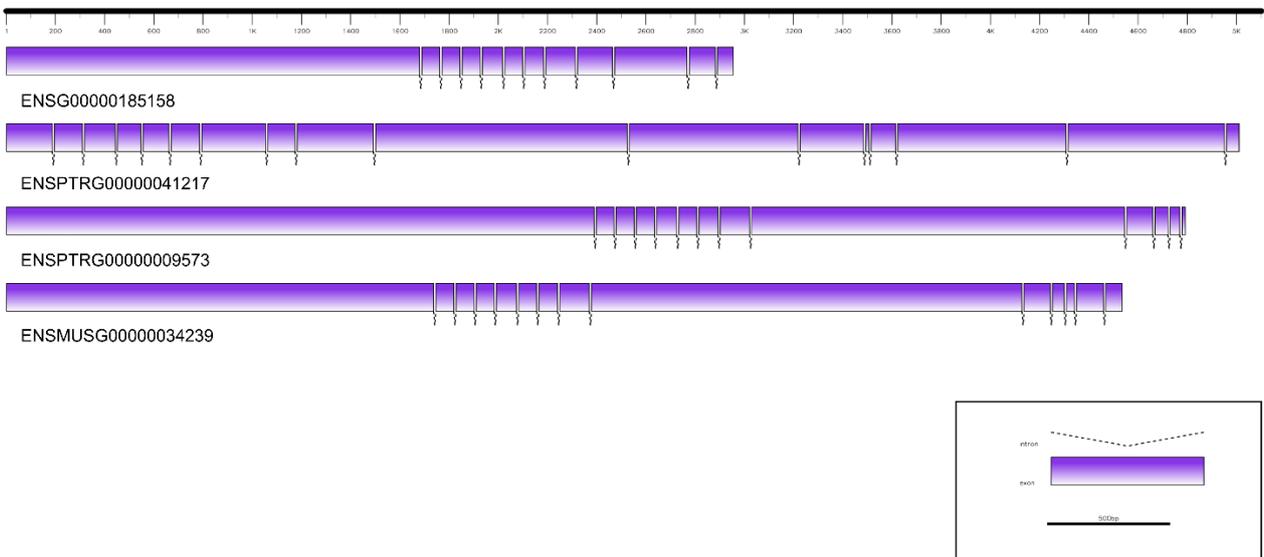
F



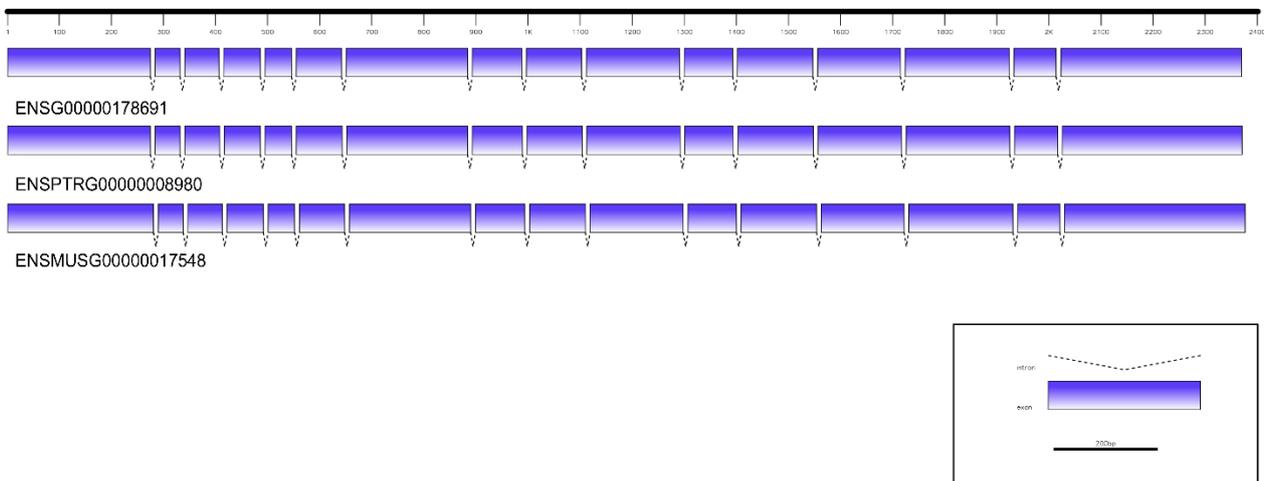
# G



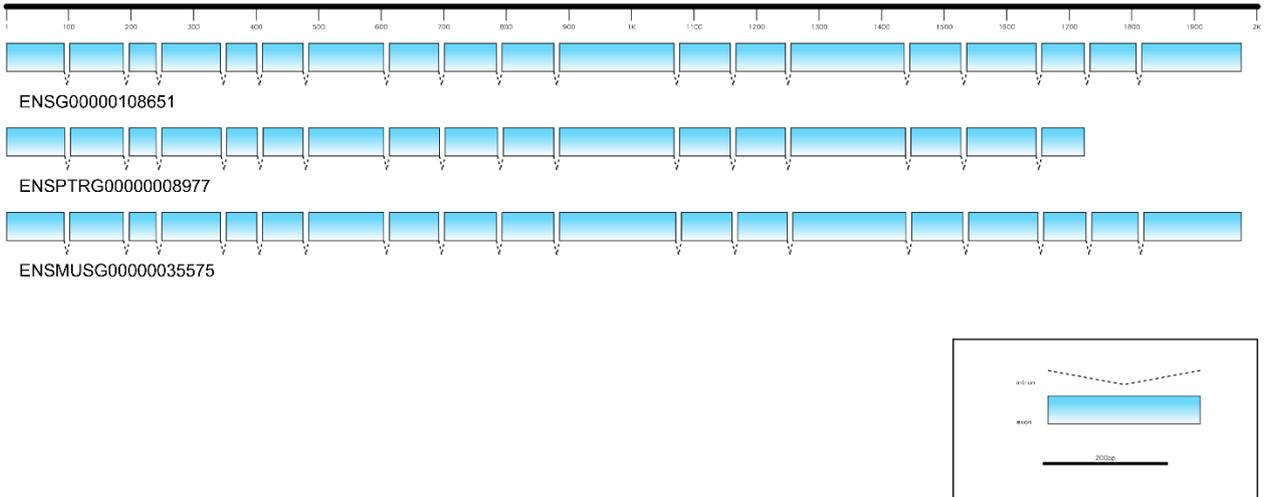
# H



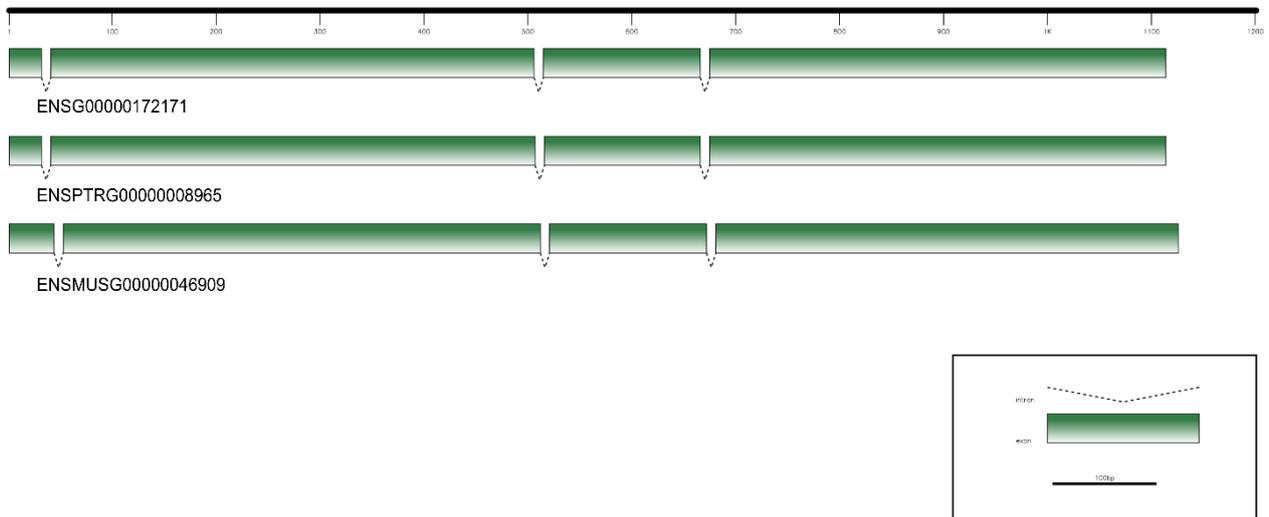
# I



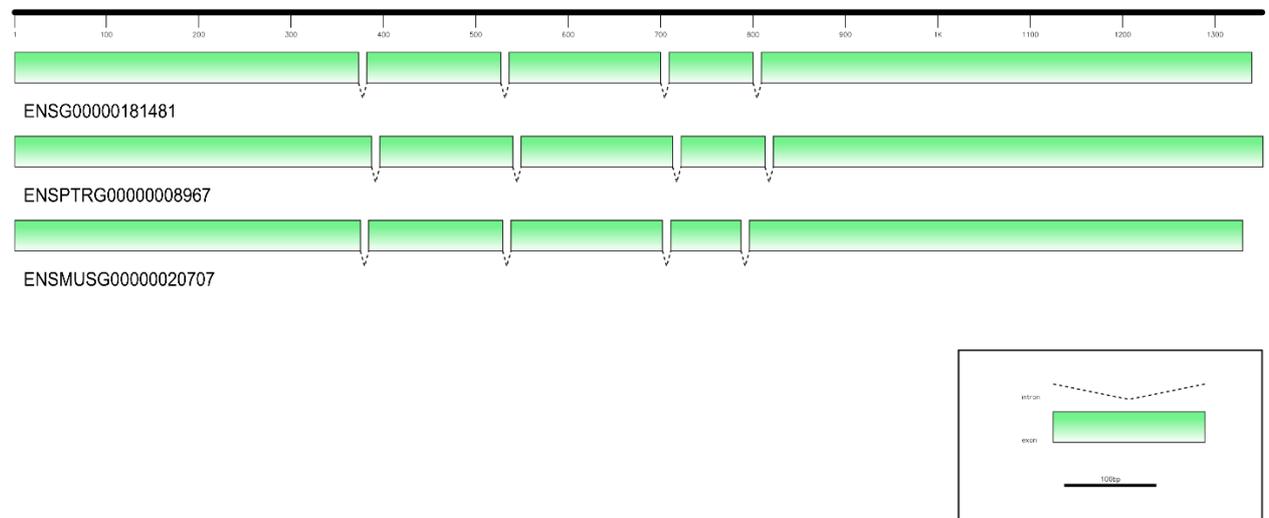
J



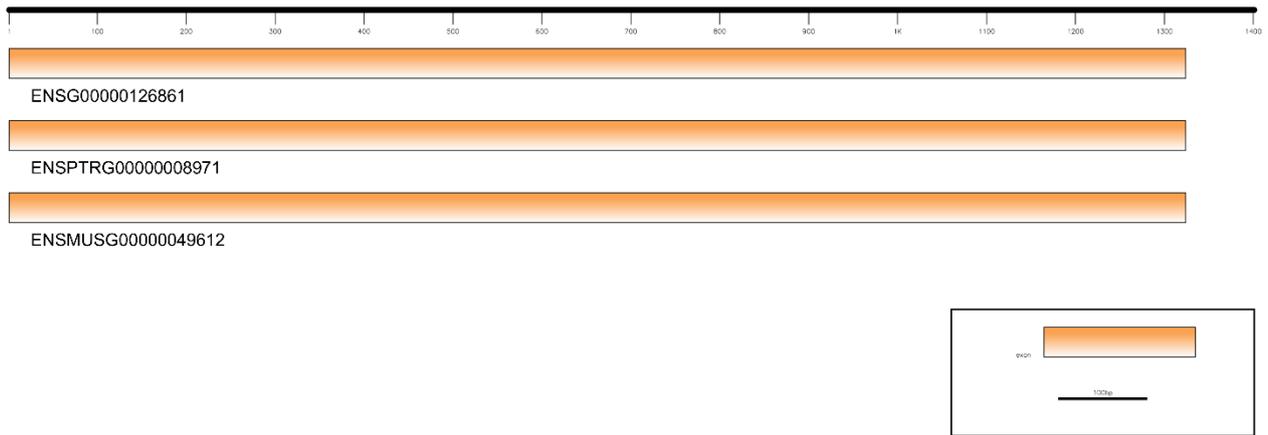
K



L



M



**Figura suplementar 2:** Organização das estruturas éxon-íntron dos genes **A** - *RAB11FIP4*, **B** - *RAB11FIP3*, **C** - *ATAD5*, **D** - *EVI2B*, **E** - *EVI2A*, **F** - *COPRS*, **G** - *CRLF3*, **H** - *LRRC37B*, **I** - *SUZ12*, **J** - *UTP6*, **K** - *TEFM*, **L** - *RNF135* e **M** - *OMG*. A primeira estrutura de cada figura é referente a espécie humana, a segunda ao chimpanzé e a terceira ao camundongo.

### **ANEXO 3. Termo de consentimento livre e esclarecido**

#### **Projeto de Pesquisa: “CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM GENODERMATOSES EM UM HOSPITAL PÚBLICO E TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL”**

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo para avaliar os aspectos clínicos e a presença de mutações em pacientes com diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1, neurofibromatose tipo 2 e esclerose tuberosa. A sua participação neste estudo envolve o preenchimento de uma ficha com seus dados pessoais e de uma ficha com seus dados demográficos e clínicos. Nessa ficha você precisará preencher seus dados de local de nascimento e residência atual, idade ao diagnóstico da doença, história familiar e complicações apresentadas. Você vai utilizar no máximo 15 minutos para preencher esta ficha. Também será realizada uma coleta de sangue (2 tubos Vacutainer® de 4mL cada), com a finalidade de obter o material para análise genética.

As complicações clínicas associadas às genodermatoses podem causar grande impacto nos pacientes. Com o advento de novas opções terapêuticas, incluindo drogas que atuam nas vias de sinalização afetadas por estas doenças, o conhecimento das mutações que originam a doença em pacientes individuais pode ser relevante para definir qual a melhor opção terapêutica. A caracterização clínica e molecular dos grupos de pacientes afetados no Sul do Brasil contribuirá para o melhor entendimento destas doenças na nossa população e os dados produzidos poderão servir de subsídio para o delineamento de novas estratégias de tratamento específicas.

O único risco potencial aos participantes deste estudo é o desconforto na coleta de sangue. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinadas para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode escolher livremente se quer ou não participar do estudo. Se você decidir por não participar, isso não afetará de maneira alguma o seu atendimento e tratamento no HCPA. Caso você aceite participar, será marcado um momento adequado para que todas as informações necessárias sejam obtidas. Permanecemos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir durante a sua participação no estudo. A pesquisadora responsável pelo estudo é a Dra. Patricia Ashton Prolla. Ela pode ser encontrada pelos telefones (51) 33598304 ou (51)33597661. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicações posteriores, os dados desse estudo serão utilizados de forma inteiramente anônima, ou seja, não haverá possibilidade de identificar os dados individuais dos participantes.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

**SIM**

**NÃO**

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

**SIM**

**NÃO**

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

**SIM**

**NÃO**

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

**SIM**

**NÃO**

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa. Caso seja necessária a utilização futura dessa amostra, o paciente será chamado para reconsentimento específico para o novo estudo.

**SIM**

**NÃO**

6. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

**SIM**

**NÃO**

7. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

**SIM**

**NÃO**

8. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. \_\_\_\_\_ a recebê-lo.

9. Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do entrevistador**  
**Data**

\_\_\_\_\_  
**Nome por extenso**

\_\_\_\_\_  
**Local e**

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

\_\_\_\_\_  
**Nome e assinatura do participante**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

\_\_\_\_\_  
**Data de nascimento**