

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**VITAMINA D, POLIMORFISMOS DO GENE VDR E
NEUROFIBROMATOSE 1**

Autora: Larissa Souza Mario Bueno

Orientadora: Patrícia Ashton Prolla

Dissertação de Mestrado

2012

Dissertação de Mestrado

2012

Autora: Larissa Souza Mario Bueno

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**VITAMINA D, POLIMORFISMOS DO GENE VDR E
NEUROFIBROMATOSE 1**

Autora: Larissa Souza Mario Bueno

Orientadora: Patrícia Ashton Prolla

Dissertação de Mestrado

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bueno, Larissa

Vitamina D, polimorfismos do gene *VDR* e Neurofibromatose 1/Larissa Souza Mario Bueno; orient. Patricia Ashton-Prolla – Porto Alegre, 2012.

103 f.

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Orientadora: Ashton-Prolla, Patricia

1. Neurofibromatose tipo 1 2. Vitamina D 3. Deficiência de vitamina D 4. Gene *VDR* 5. Polimorfismo *FokI* e *BsmI* 6. Porto Alegre I Prolla, Patricia Ashton II Título.

UFRGS

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“O impossível existe até quando alguém duvide dele e prove o contrário.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Auta Souza Mario Bueno e Lutero Bueno, aos meus irmãos, Debora e Leonardo, aos meus sobrinhos, Luca e Isabela, aos meus cunhados, Laiane e Pedro, pelo apoio e compreensão.

Agradeço à tia Tanit pelo incentivo para que eu seguisse meus sonhos, mesmo quando eles pareciam ir contra o senso comum.

Agradeço aos meus amigos e ao Silvio Takashi Suguino pelo apoio.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Patricia Ashton Prolla pela dedicação, orientação e compreensão durante o Mestrado.

Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo Maestri, ao Dr. José Arthur Chies e à Dra Cristina Brinckmann Oliveira Netto pela colaboração.

Agradeço especialmente a Ernestina Aguiar por ter me ajudado quando mais precisei, no momento essencial para a realização do projeto.

Agradeço a Rosana Scalco pela ajuda na elaboração e execução do projeto, assim como a todos que dele participaram.

Agradeço aos professores que estiveram presentes na minha vida durante a graduação, a residência médica e o Mestrado por estimularem meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos do Serviço de Genética Médica, do Laboratório de Medicina Genômica e do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas Porto Alegre pela colaboração na realização projeto.

Agradeço às demais pessoas que contribuíram e incentivaram de qualquer forma a realização deste trabalho, em especial aos pacientes pelo esforço para que este trabalho desse certo.

A todos, meu sincero agradecimento.

Dedicatória

Dedico meu trabalho a todos os pacientes e às demais pessoas que também se dedicaram a ele.

O projeto de pesquisa que originou essa dissertação de Mestrado foi desenvolvido no Hospital de Clínicas Porto Alegre (HCPA), RS, com o apoio do serviço de Genética Médica, do Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental e do Laboratório de Patologia Clínica, e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o apoio do Laboratório de Imunogenética e Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

O projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e pelas taxas de bancada dos pesquisadores orientadores.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob o número 09-479; tendo sido também utilizadas amostras de DNA dos pacientes que fazem parte do projeto de pesquisa 05-351 aprovado pelo mesmo comitê.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1	16
2.1.1 Bases genéticas	16
2.1.1 Manifestações clínicas	18
2.1.2 Diagnóstico	28
2.2 VITAMINA D	29
2.3 RECEPTOR DE VITAMINA D	36
2.3.1 Gene do <i>VDR</i>	38
2.3.2 Polimorfismo do gene <i>VDR</i>	39
2.4 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1 E VITAMINA D	41
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	45
5 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	46
6 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIENTÍFICA <i>Genetics and Molecular Biology</i>	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
ANEXOS	80
ANEXO A – Escala de Riccardi.....	81
ANEXO B – Logística do estudo	83
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para dosagem de 25(OH)D de pessoas com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1	84
ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para dosagem de 25(OH)D de pessoas sem diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1	86
ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue e extração de DNA de pessoas com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1	88
ANEXO F – Ficha Clínica	92
ANEXO G – Curva de calibração e resultados da dosagem de 25(OH)D.....	93

ANEXO H – Folha Informativa.....	97
ANEXO I – Modelo de laudo para resultado de exame normal de vitamina D	98
ANEXO J – Modelo de laudo para resultado de exame com insuficiência de vitamina D	99
ANEXO K – Modelo de laudo para resultado de exame com deficiência de vitamina D	100
ANEXO L – Perfil clínico dos pacientes com Neurofibromatose tipo 1 que participaram deste estudo	101

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 1,25(OH)₂D – 1,25-*dihydroxyvitamin D* (1,25-dihidroxitamina D)
- 25(OH)D – 25-*hydroxyvitamin D* (25-hidroxitamina D)
- 3'UTR – 3' *untranslated region* (região 3' não traduzida)
- 5'UTR – 5' *untranslated region* (região 5' não traduzida)
- cAMP – Monofosfato de Adenosina Cíclico
- CLBPA – Teste Automatizado de Quimioluminescência de Ligação à Proteína
- CLIA – Imunoensaio Quimioluminescente
- CBPA – Ensaio por Ligação Competitiva à Proteína
- CLS – *Café-au-lait spots* (Manchas café-com-leite)
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- EIA – Ensaio Imunoenzimático
- FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
- GAPs – Proteínas Ativadoras GTPase
- GRD – Domínio Relacionado a GAPs
- HAART – Terapia Anti-retroviral Potente
- HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão
- HPLC-APCI-MS – técnica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Ionização Química em Pressão Atmosférica-Espectrometria de Massa
- IL-12 – Interleucina 12
- kb – quilobase
- kDa – quilodalton
- MAP – Proteína cinase Ativada por Mitógeno
- MS – Espectrometria de Massa
- NF – Neurofibroma
- NFC – Neurofibroma cutâneo
- NFP – Neurofibroma plexiforme
- NF1 – *Neurofibromatosis type 1* (Neurofibromatose tipo 1)
- NL – *Lisch Nodules* (Nódulos de Lisch)
- ng/mL – nanograma por mililitro
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PI3K – Inositol Tri-fosfato

PKA – Proteína Quinase A
PTH – Paratormônio
RIA – Radioimunoensaio.
RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)
RXR – *Retinoid X Receptor* (Receptor X Retinóico)
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UBOs – Objetos Brilhantes não Identificados
UFURGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UVB – Radiação Ultravioleta B
VDR – *Vitamin D Receptor* (Receptor da Vitamina D)
VDRE – *Vitamin D Response Element* (Elementos de Resposta à Vitamina D)
VNTR – *Variable Number Tandem Repeat* (Número Variável de Repetições em Tandem)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da interação de NF1 com Ras e a via do inositol-tri-fosfato..	17
Figura 2 - Manchas café-com-leite em paciente com Neurofibromatose tipo1	20
Figura 3 - Numerosos neurofibromas cutâneos de vários tamanhos em um paciente adulto com Neurofibromatose tipo 1	22
Figura 4 - Foto de paciente com Neurofibromatose tipo 1 apresentando efélides axilares	22
Figura 5 - Foto de paciente com Neurofibromatose tipo 1 apresentando Nódulos de Lisch	24
Figura 6 - Metabolismo da vitamina D	30
Figura 7 – Ações do paratormônio e da vitamina D	32
Figura 8 - A interação entre a vitamina D e as células alvo.....	37
Figura 9 – Estrutura do gene <i>VDR</i> e localização dos principais polimorfismos conhecidos	38
Tabela 1 – As principais características clínicas da Neurofibromatose 1, a idade de início e a frequência.	19
Tabela 2 - Critérios diagnósticos para Neurofibromatose tipo 1 pelo National Institute of Health (NIH), Consensus Development Conference, 1988	28
Tabela 3 – Causas de deficiência de Vitamina D	34
Tabela 4 - Prevalência dos polimorfismos <i>FokI</i> e <i>BsmI</i> do gene <i>VDR</i> em diferentes grupos étnicos	41
Tabela 5 – Prevalência de diferentes haplótipos do gene <i>VDR</i> em diferentes grupos étnicos.....	41

RESUMO

Introdução: A Neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma doença genética autossômica dominante causada por mutação no gene *NF1* (17q11.2; proteína neurofibromina). A incidência é de aproximadamente 1:3500 recém-nascidos e o diagnóstico clínico é possível na maioria dos casos. Alguns estudos sugeriram que pacientes com NF1 são mais suscetíveis a apresentar deficiência de vitamina D quando comparados à população geral.

Objetivo: Determinar os níveis de 25(OH)D em indivíduos com NF1 e em controles saudáveis. Nos pacientes com NF1 nos também avaliamos o fenótipo clínico e analisamos polimorfismos comuns do gene *VDR* (*BsmI* e *FokI*) para avaliar se estavam correlacionados com os níveis de 25(OH)D.

Métodos: Estudo de caso-controle que incluiu 45 pacientes com NF1 do Sul do Brasil e 45 controles saudáveis pareados por idade, sexo e tipo de pele de acordo com a classificação de Fitzpatrick.

Resultados e Conclusões: Setenta e sete vírgula oito por cento dos 90 sujeitos de pesquisa apresentaram níveis de 25(OH)D abaixo de 30ng/ml. Deficiência de 25(OH)D (<20ng/mL) foi observada em 28 (31,1%) e insuficiência (de 20 a 30ng/mL) em 42 (46,6%). Deficiência ou insuficiência de 25(OH)D não foi mais frequente em pacientes com NF1 do que em controles ($p=0,074$). Nos não observamos qualquer associação entre os polimorfismos do gene *VDR* e os níveis de vitamina D sugerindo que o fenótipo da insuficiência ou deficiência bioquímica de 25(OH)D nos pacientes estudados não está associado com essas variantes genéticas.

Palavras-chave: Neurofibromatose tipo 1 . Vitamina D . Deficiência de vitamina D . Neurofibromas . Hipovitaminose D . Polimorfismo *FokI* e *BsmI* . gene *VDR* . Humanos . Brasil

ABSTRACT

Introduction: Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disorder caused by mutations in the *NF1* gene (17q11.2, neurofibromin). The estimated incidence is approximately 1:3500 newborns and clinical diagnosis is possible in the majority cases. A few studies suggest that patients with NF1 are more likely to have vitamin D deficiency when compared to the general population.

Objectives: The goal of the study was to determine the levels of 25-OH-vitamin D [25(OH)D] in individuals with NF1 and disease-unaffected controls. In NF1 patients we also assessed clinical phenotype and analyzed common *VDR* gene polymorphisms (*BsmI* and *FokI*) to verify whether they were associated with lower vitamin D levels.

Methods: Case-control study that included 45 NF1 patients from Southern Brazil and 45 healthy controls matched by sex, skin type and age to the cases.

Results and conclusions: Overall, 70 (77.8%) of the individuals studied had levels of 25(OH)D below 30ng/ml: vitamin D deficiency was observed in 28 (31.1%) and vitamin D insufficiency in 42 (46.6%) subjects. 25(OH)D deficiency or insufficiency were not more frequent in NF1 patients than in controls ($p=0,074$). We did not observe an association of *VDR* gene polymorphisms and vitamin D levels suggesting that the insufficient or deficient biochemical phenotypes in the patients studied here are not associated with these genetic variants.

Key words: Neurofibromatosis type 1. Vitamin D . Neurofibromas . Hypovitaminosis D . *BsmI* e *FokI* Polymorphism . *VDR* gene . Human . Brazil

1 INTRODUÇÃO

Os pacientes com diagnóstico de Neurofibromatose tipo 1 (NF1) podem apresentar sinais estigmatizantes, como os neurofibromas (NF) cutâneos e plexiformes e as manchas café-com-leite (CLS), que podem levar a constrangimento e prejuízo na vida social, bem como baixa auto-estima e problemas de relacionamento interpessoal (ABLON, 1996). Ainda, os NF cutâneos e em especial os NF plexiformes, entre outros sinais da NF1, podem ser fatores de importante morbidade e mortalidade para esses pacientes (HERSH et al, 2008; RICCARDI & EICHNER, 1986; TROVÓ et al, 2002; FERNER et al, 2007; WILLIAMS et al, 2009).

Os pacientes com NF1 frequentemente apresentam comprometimento esquelético. A patogênese dessas lesões é pobremente compreendida até o momento. A doença óssea pode ser focal, como na displasia tibial ou de osso esfenóide ou na escoliose distrófica (em que há alterações na estrutura das vértebras), mas alterações generalizadas já foram amplamente demonstradas nesses pacientes, e incluem osteomalácia, osteopenia, osteoporose e baixa estatura (CRAWFORD et al, 1999; BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; ELEFTERIOU et al, 2009; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010). Os principais sinais cutâneos da NF1, NF e CLS surgem precocemente (em alguns casos estão presentes no nascimento) e aumentam em tamanho e número ao longo da vida. Embora intervenções curativas para essas lesões não tenham sido identificadas, alguns estudos iniciais, principalmente em animais, demonstram melhora clínica (diminuição do número e tamanho de NF cutâneos e CLS) com o uso de vitamina D tópica (NAKAYAMA et al, 1997; NAKAYAMA et al, 1999; YOSHIDA et al, 2007).

Em 2006, Lammert et al publicaram o primeiro estudo mostrando que pacientes com NF1 na Alemanha apresentam níveis de 25-hidroxi-vitamina D [25(OH)D] significativamente menores do que indivíduos saudáveis, e encontrou dados sugerindo correlação inversa entre os níveis de vitamina D e o número de NF cutâneos (LAMMERT et al, 2006). Em sequência, outros 5 estudos, três na Alemanha, dois nos Estados Unidos da América e um na Itália, evidenciaram níveis mais baixos de 25(OH)D em pessoas com NF1 do que na população geral

(BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010; STEVENSON et al, 2011, PETRAMALA et al, 2011).

Sendo assim, há várias evidências de que a hipovitaminose D possa estar envolvida na patogenia das alterações ósseas, neurológicas e cutâneas da doença. Quando presente, a deficiência de 25(OH)D pode estar associada à doença óssea e outras co-morbidades e deve ser corrigida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

Os primeiros relatos de indivíduos com um fenótipo compatível com a neurofibromatose do tipo 1 (NF1) são tão antigos como o de Akenside em 1768. A primeira descrição detalhada da doença, no entanto, foi realizada por Friedrich Von Recklinghausen em 1882, daí a denominação de Doença de Von Recklinghausen. A NF1 é uma doença genética pleiotrópica caracterizada predominantemente por manifestações neuroectodérmicas e predisposição ao desenvolvimento de tumores (RICCARDI & EICHNER, 1986). A NF1 apresenta herança autossômica dominante e está associada a mutações germinativas no gene *NF1*, localizado em 17q11.2, que codifica a proteína neurofibromina. Os achados clínicos da doença podem ser aparentes no nascimento ou surgir ao longo da vida. A incidência é aproximadamente 1:3500 (FRIEDMAN, 1999). A NF1 apresenta expressividade variável, e na maioria das vezes os pacientes são levemente afetados. A penetrância é muito alta e aumenta com a idade, sendo que aos 4 anos de idade o diagnóstico clínico é inequívoco na grande maioria dos pacientes. Em muitos casos o diagnóstico é feito tardiamente ou nunca reconhecido, no entanto, a morbidade e mortalidade da doença podem ser consideráveis e são difíceis de se prever. Geralmente a incidência de complicações é superestimada, pois os relatos publicados incluem em sua maioria pacientes identificados em hospitais e clínicas de referência, que têm um viés em favor do recrutamento de pacientes com as formas mais graves da doença (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

2.1.1 Bases genéticas:

O gene *NF1*, localizado em 17q11.2, possui 60 éxons (numerados de 1 a 49, alguns subdivididos e categorizados por letras) e 350Kb de DNA genômico. Apresenta três isoformas originadas por sítios alternativos de processamento (LIMA, 2004) e codifica uma proteína chamada neurofibromina, formada por 2818 aminoácidos com

peso molecular de 327KDa. Embora ubíqua, esta proteína apresenta expressão mais elevada no sistema nervoso.

A neurofibromina age através da supressão de ação de outras proteínas celulares como a Ras, codificada por um proto-oncogene, e que normalmente estimula o crescimento e a proliferação celular. A neurofibromina é uma proteína funcional e estruturalmente homóloga às proteínas ativadoras GTPase (GAPs), e seu domínio relacionado a GAPs (GRD) pode estimular a atividade GTPase intrínseca de Ras, inativando-a (Ras ligada a um GDP). Quando ativada, Ras ligada a GTP inibe a apoptose via inositol tri-fosfato (PI3K) e estimula a proliferação celular através da via RAF-MAP quinase, como demonstrado na Figura 1 (TROVÓ et al, 2002; LIMA, 2004).

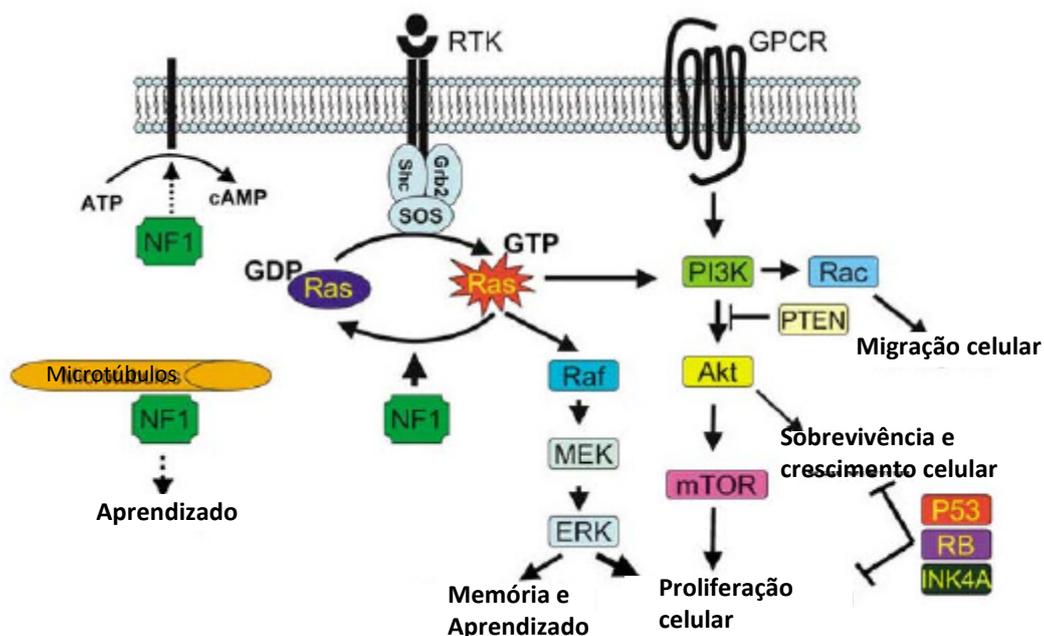


Figura 1: Representação da interação de NF1 com Ras e a via do inositol-tri-fosfato (PI3K). NF1 restringe a atividade celular normal. Entretanto, perda da expressão de NF1 leva à elevação da atividade de Ras, desregulando o crescimento celular e a tumorigênese. NF1 pode ainda estar associada com microtúbulos e modular a via do monofosfato cíclico de adenosina-fosfoquinase A (cAMP-PKA).

Fonte: modificado de LE & PARADA, 2007.

O gene *NF1* é supressor de tumor e age bloqueando o desenvolvimento de tumores via supressão da proliferação celular. Em situação fisiológica, após estímulo por fatores de crescimento, a célula degrada a neurofibromina, permitindo a sinalização

da via de Ras para estimular a proliferação celular. Após cerca de 60 a 90 minutos, os níveis de neurofibromina voltam ao normal, interrompendo esta sinalização, formando assim uma “alça” de retroalimentação negativa compensatória. Na ausência de neurofibromina funcionante há hiperfunção desta via, pois Ras estaria associada a GTP, em sua forma ativa, por um tempo maior. (WEINBERG, 2008).

Além do transcrito que origina a proteína neurofibromina, três genes (*EVI2A*, *EVI2B* e *OMGP*) estão embutidos dentro de um dos íntrons do gene *NF1*, todos com orientação de transcrição oposta e sem uma função claramente definida até o momento (MCKUSICK, 2011). *Loci* homólogos ao *locus* do gene *NF1* formam pseudogenes, que podem estar envolvidos na alta taxa de mutações *de novo*, por erro de pareamento, observada entre os indivíduos afetados (LIMA, 2004).

Foram descritas várias mutações no gene *NF1*, todas relacionadas com a perda de função da neurofibromina, principalmente originando proteínas truncadas. A análise de mutação é muito complexa pelo grande tamanho do gene, presença de pseudogenes e grande variedade de possíveis anormalidades sem presença de *hotspots* mutacionais. Mutações de ponto geralmente têm origem paterna, enquanto a maior parte das deleções intragênicas é de origem materna. (LIMA, 2004; LE & PARADA, 2007)

Algumas correlações genótipo-fenótipo foram estabelecidas na *NF1*. Pacientes clinicamente mais graves, com pior desempenho cognitivo, tendência a hipercrecimento e dismorfias faciais são mais comumente portadores de deleções intragênicas (KLUWE et al, 2004); de forma paradoxal, a ausência de neurofibromas está associada à deleção c2970-2972 delAAT (UPADHYAYA et al, 2007). Até o momento não foram estabelecidas correlações genótipo-fenótipo em relação à presença de hipovitaminose D.

2.1.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas nos pacientes com NF1 podem variar ao longo da vida, pois a expressividade aumenta com a idade. A Tabela 1 mostra os principais achados da NF1, assim como a idade média em que dada manifestação é diagnosticada e a frequência com que ocorre.

Tabela 1 - Principais características clínicas da Neurofibromatose 1, idade de início e a frequência.

Características	Idade de Início	Frequência
Manchas café com leite	Até os dois anos	99%
Sardas axilares e inguinais	Entre três e cinco anos	Acima de 90%
Nódulos de Lisch	Infância/Adolescência	95%
Neurofibromas Cutâneos	Variável, pode aumentar de tamanho durante a adolescência e gestação	0-9 anos 14% 10-19 anos 44% 20-29 anos 85% Acima de 30 anos 95%
Neurofibromas Plexiformes	Congênito	25%
Displasia de tíbia e esfenóide	Visível clinicamente em torno de um ano	1% - 4% displasia tibial 3% - 7% displasia de esfenóide
Dificuldade de Aprendizado	Idade escolar	20% - 50%
Déficit de Atenção e Hiperatividade	Infância	20% - 40%
Glioma Óptico	Infância e pode ser assintomático	15%
Tumor de Bainha de Nervo Periférico	Idade média ao diagnóstico é de 28 anos	4-13%

Fonte: modificado de Scriver et al, 2000.

As **manchas café-com-leite** (CLS) (Figura 2) geralmente são a manifestação inicial da NF1 e podem estar presentes no nascimento. Cerca de 80% dos pacientes com NF1 apresentarão mais de cinco MCCL com um ano de vida. Elas tendem a aumentar em número e tamanho de um a cinco anos e na adolescência (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

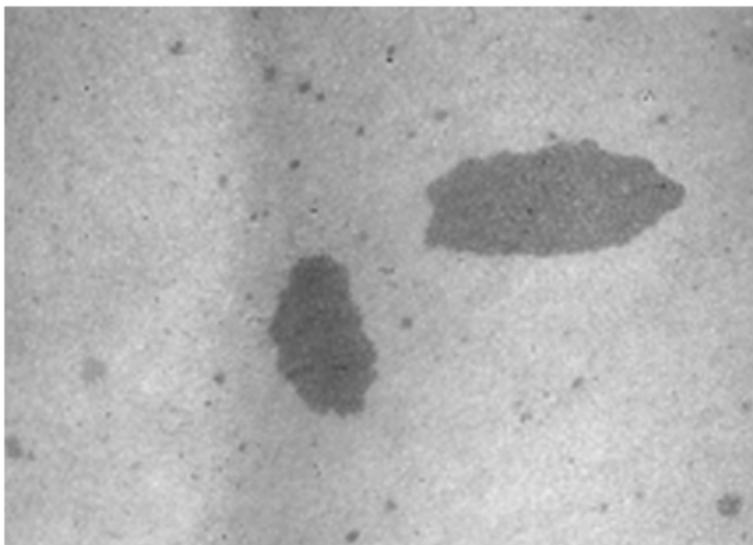


Figura 2 - Manchas café-com-leite em paciente com Neurofibromatose tipo1.

Fonte: modificada de Jett & Friedman, 2010.

Os **neurofibromas** (NF) (Figura 3) são tumores que surgem de e estão ligados aos nervos periféricos ou centrais, inclusive os nervos cranianos. Cerca de 5% dos NF (especialmente os plexiformes) evoluem com malignização e alguns estão associados a prurido. Os NF podem voltar a crescer após a retirada cirúrgica. Microscopicamente eles revelam proliferação de todos os elementos do nervo periférico, incluindo nervos, células de Schwann e fibroblastos adjacentes. Duas lesões histológicas e talvez biologicamente distintas são denominadas neurofibromas (RICCARDI & EICHNER, 1986; LIMA, 2004; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010):

- A forma mais comum ocorre na pele (neurofibroma cutâneo, NFC) ou no nervo periférico da derme (neurofibroma subcutâneo). Os NFC se movem juntamente com a pele, enquanto os subcutâneos permanecem em seu lugar ao deslizarmos a pele. O risco de transformação maligna desses tumores é extremamente pequeno e a morbidade ocorre principalmente por questões estéticas. Eles geralmente aparecem no período pré-púbere e estão presentes em virtualmente todos os adultos com NF1. São vistos como nódulos ou lesões exofíticas de tecido cutâneos ou subcutâneos, como depressões na pele abaixo de manchas hipocrômicas púrpura ou como nódulos ou espessamentos em forma de cordas firmes no tecido subcutâneo profundo. O aumento em número e tamanho coincide com a

puberdade e a gestação, mas o crescimento intermitente pode persistir por toda a vida (RICCARDI & EICHNER, 1986; LIMA, 2004; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

- O segundo tipo é o neurofibroma plexiforme (NFP), que é considerado por alguns como de ocorrência exclusiva nos pacientes com NF1. Estes tumores demonstram perda do alelo normal do gene *NF1*. A principal preocupação no cuidado com estes pacientes é a dificuldade na remoção cirúrgica quando eles comprometem os troncos neurais principais, uma vez que têm um potencial significativo para transformação maligna (principalmente nos grandes e aderidos aos troncos neurais principais do pescoço ou extremidades) ou para comprimir estruturas adjacentes. Eles podem se localizar em qualquer região ao longo do nervo, embora a localização mais comum seja em grande tronco nervoso; são frequentemente múltiplos. Não é possível separar a lesão do nervo e as margens podem ser pobremente definidas. Os neurofibromas plexiformes ocorrem em aproximadamente 25% dos pacientes com NF1 e geralmente são congênitos. São reconhecidos como um aumento de partes moles ou área cutânea hiperpigmentada com ou sem hipertricose ou como massa subcutânea envolvendo tecidos profundos. Essas lesões podem ocorrer em qualquer órgão, dando origem a sintomas que variam de acordo com o local, o tamanho e o grau de invasão nos tecidos adjacentes. Crescimento importante pode ocorrer em qualquer momento e ser seguido de período quiescente (RICCARDI & EICHNER, 1986; LIMA, 2004; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Neurofibromas de Trato Gastrointestinal são pouco frequentes e ocorrem principalmente após os 5 anos de idade. Podem causar sangramento, anemia, sinais de obstrução intestinal mecânica, perda de peso, aumento do volume abdominal, dor abdominal, diarréia crônica, vômitos frequentes e sinais de má absorção (RICCARDI & EICHNER, 1986; LIMA, 2004; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

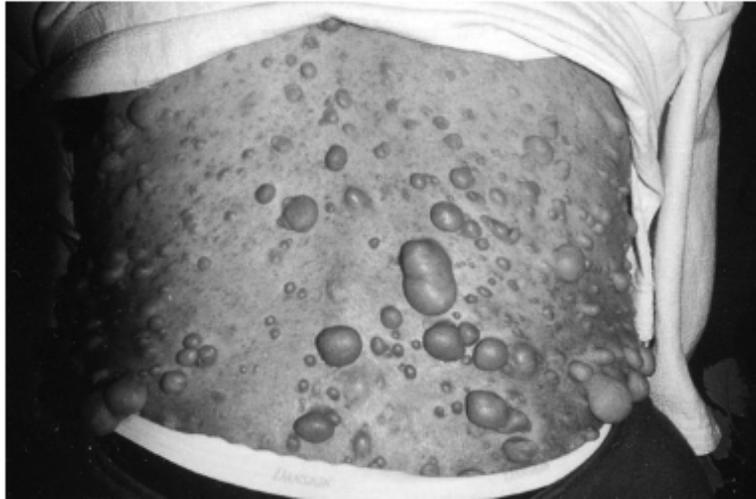


Figura 3 - Numerosos neurofibromas cutâneos de vários tamanhos em um paciente adulto com Neurofibromatose tipo1.

Fonte: modificada de Jett & Friedman, 2010.

As **efélides** (Figura 4) que ocorrem nas regiões axilares e inguinais geralmente são o segundo sinal a ser notado. Tipicamente surgem por volta dos três a cinco anos e estão presentes em aproximadamente 75% dos pacientes com NF1 (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).



Figura 4 - Foto de paciente com Neurofibromatose tipo1 apresentando efélides axilares.

Fonte: modificada de Jett & Friedman, 2010.

A **displasia tibial**, quando presente, ocorre no nascimento e se manifesta como um abaulamento anterolateral de membro inferior. É necessária intervenção ortopédica precoce, pois está associada a risco de fraturas e formação de pseudoartrose, que

resulta da cicatrização incorreta e deformação do membro. Ocorre em 2% a 3% das crianças com NF1 (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; ELEFTERIOU et al, 2009).

A **displasia do osso esfenóide** ocorre em 5% dos pacientes com NF1 e geralmente é unilateral. Pode ocorrer proptose em alguns casos e desenvolvimento de neurofibroma plexiforme ipsilateral em região temporo-orbital em 50% dos casos (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; ELEFTERIOU et al, 2009).

O **glioma de vias ópticas** está presente em aproximadamente 15% das crianças com NF1. É o tumor de SNC mais frequente na NF1 e geralmente ocorre em crianças abaixo dos seis anos. Embora sua história natural seja com frequência indolente, em um terço dos casos pode tornar-se sintomático e em 5% dos casos pode levar à perda visual, proptose severa e hidrocefalia. Puberdade precoce pode ocasionalmente ser uma de suas complicações quando acomete o quiasma óptico. O tratamento é necessário em um pequeno percentual dos casos em que há sintomas por crescimento tumoral significativo ou perda visual progressiva. O *The National Neurofibromatosis Foundation Optic Pathway Task Force* não recomenda triagem para esse tumor com exames de neuroimagem, porém exame oftalmológico periódico é recomendado para todas as crianças (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Os **Nódulos de Lisch** (Figura 5) são hamartomas pigmentados de íris e geralmente surgem no início da adolescência. Não apresentam nenhum significado clínico, a não ser para o diagnóstico (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

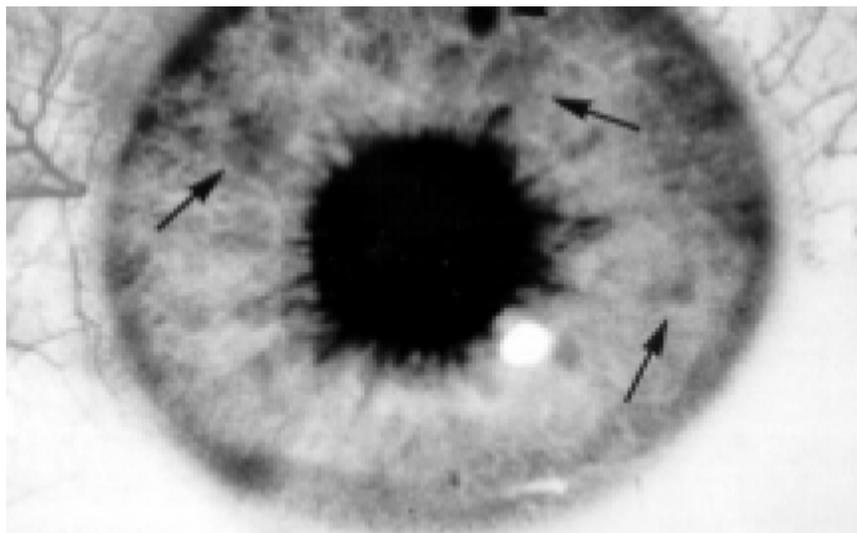


Figura 5 - Foto de paciente com Neurofibromatose tipo1 apresentando Nódulos de Lisch.

Fonte: modificado de Jett & Friedman, 2010.

Aproximadamente um terço dos pacientes desenvolve sérias complicações, que geralmente decorrem do envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas por neurofibromas plexiformes e do desenvolvimento de tumores. O risco vital para desenvolvimento de diferentes tumores está aumentado na síndrome em relação à população geral. Dentre os tumores encontrados com maior frequência nesses pacientes, e indubitavelmente associados à NF1, estão: neurofibromas, gliomas de via óptica, tumores malignos da bainha de nervo periférico, feocromocitoma, rabdomyossarcoma, leucemia, outros tumores de sistema nervoso central, câncer de mama e carcinoma medular da tireóide. (SHARIF et al, 2007; WALKER et al, 2006).

O tumor maligno da bainha de nervo periférico é a neoplasia maligna mais comum e ocorre em 5% a 10% dos pacientes com NF1. Eles geralmente se desenvolvem na idade adulta e são descobertos pela presença de dor ou crescimento rápido de neurofibroma plexiforme ou cutâneo, embora essas manifestações também possam ocorrer em tumores benignos (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Convulsões ocorrem em 6% a 7% dos casos. É necessário descartar a presença de tumores intracranianos, embora a etiologia seja frequentemente indefinida. Alterações eletroencefalográficas são frequentes, mas EEG não está recomendado

rotineiramente (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Outros achados incluem macrocefalia, que ocorre na maioria dos pacientes, e baixa estatura, que ocorre em um terço dos pacientes, mas não parece estar relacionada com a gravidade da doença. A velocidade de crescimento é normal, mas o pico de crescimento na puberdade é reduzido. Existem tabelas de crescimento próprias para acompanhar o crescimento de crianças com NF1 (RICCARDI & EICHNER, 1986; CLEMENTI et al, 1999; SZUDEK et al, 2000; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010). Um estudo brasileiro evidenciou força muscular reduzida em 67% dos pacientes (SOUZA, 2009).

Alterações ósseas incluem fibromas não ossificantes de ossos longos, principalmente de fêmur distal e tíbia proximal; ocorrem na adolescência e na idade adulta e podem resultar em fraturas. Escoliose ocorre em 10 a 30% dos pacientes e pode ser idiopática ou congênita por alterações na morfologia das vértebras; a progressão é variável e deve ser acompanhada cautelosamente, podendo causar diminuição da função pulmonar. Há risco aumentado para osteoporose na idade adulta conforme mostram alguns trabalhos que discutiremos no item 2.2 (RICCARDI & EICHNER, 1986; ELEFTERIOU et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Há aumento do risco para hipertensão arterial, que mais comumente é essencial, porém devemos ponderar a possibilidade de hipertensão arterial por doença renovascular, tumor secretor de componentes vasoativos ou coarctação da aorta (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Deficiência Mental ocorre em 4% a 8% dos pacientes; na maioria dos pacientes, as habilidades intelectuais encontram-se iguais ou logo abaixo da média. Cerca de 40% a 60% das crianças apresentam dificuldade na leitura que pode estar diretamente relacionada a um déficit de percepção visual-espacial e na localização espacial.

Dificuldades na fala podem ocorrer em associação com a insuficiência velofaríngea. Dificuldade na coordenação motora fina pode levar a dificuldade na escrita. Raramente observa-se um fenótipo similar ao autismo, principalmente associado a deleções gênicas. Prejuízo em pelo menos uma das atividades escolares é notado em 65% das crianças. Déficit de atenção e hiperatividade também é mais frequente neste grupo de pacientes (RICCARDI & EICHNER, 1986; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009; JETT & FRIEDMAN, 2010).

Em cerca de 60% das crianças são observadas áreas com aumento da intensidade de sinal em T2 na ressonância magnética de encéfalo chamadas de “objetos brilhantes não identificados” (ou *Unidentified Bright Objects*, UBOs). Os UBOs ocorrem no trato óptico, nos gânglios da base, cérebro, cerebelo e córtex e geralmente não estão associados a efeito de massa. UBOs típicos não são visualizados nas tomografias computadorizadas e nas ressonâncias magnéticas em T1. Eles mostram sinais de mielina alterada e correspondem patologicamente a áreas de mielopatia espongiiforme. Os UBOs podem desaparecer com a idade e são menos comuns em adultos do que em crianças. O significado clínico dos UBOs ainda não está claro, mas alguns estudos correlacionam a presença, o número, o volume e a localização com o déficit na linguagem em crianças com NF1 (HERSH et al, 2008).

Em relação à gravidade do fenótipo, os pacientes com NF1 podem ser classificados de acordo com duas escalas:

Escala de Gravidade de Riccardi (RICCARDI & EICHNER, 1986): Esta escala visa classificar os pacientes com diagnóstico de NF1 em diferentes níveis de gravidade. O protocolo foi criado com base na história clínica, exame físico, avaliação oftalmológica, avaliação do coeficiente de inteligência, testes psicológicos, tomografias computadorizadas das órbitas e de crânio, radiografias de tórax, esqueleto e coluna, eletroencefalograma, avaliação auditiva, hemograma, exame de elementos anormais e sedimentos urinários e dosagem da glicemia de jejum. Nem todos esses exames são indicados para todos os pacientes. Para classificação dos

pacientes é usada uma tabela correlacionando os achados aos graus de gravidade (ANEXO A).

- Grau 1 ou NF1 mínima: poucos achados que não comprometem a saúde ou a qualidade de vida. Exceto pelas MCCL e NF, é definido pela ausência de sintomas;
- Grau 2 ou NF1 leve: presença de estigmas suficientes para a doença parecer óbvia e ser fonte de preocupações, mas sem comprometimento significativo à saúde;
- Grau 3 ou NF1 moderada: presença de achados da NF1 com comprometimento inequívoco à saúde e ao bem-estar, mas que podem ser razoavelmente conduzidos, que não sejam intratáveis ou que não levarão invariavelmente à diminuição da expectativa de vida. É um grupo com achados variados e onde se encontra a maioria dos pacientes; e
- Grau 4 ou NF1 grave: comprometimento significativo e geralmente intratável, com manejo difícil ou diminuição da expectativa de vida. Convulsões resistentes ao tratamento medicamentoso, deficiência mental moderada a profunda, tumores de sistema nervoso central e outros tumores malignos contribuem para essa classificação.

Escala de Visibilidade de Ablon (ABLON, 1996): É baseada na aparência da pessoa completamente vestida, apenas com pescoço, cabeça e mãos visíveis, e andando. Avalia como os sintomas podem ser percebidos numa interação impessoal. Dessa forma, os pacientes que apresentam apenas lesões em áreas cobertas pelas roupas podem ter visibilidade leve, mas com grave repercussão no comportamento sexual. Não há diferença significativa entre os dois sexos em relação à visibilidade.

- Leve: essencialmente sem tumores visíveis nas áreas não cobertas pelas roupas e marcha e postura dentro dos padrões normais quando observada casualmente;
- Moderada: alguns tumores no pescoço, na face e nas mãos, escoliose moderada e outros achados esqueléticos sem alteração visível na marcha; e
- Grave: numerosos tumores em face, glioma óptico com deformidade do globo ocular, deformidades esqueléticas evidentes por alterações na marcha e escoliose grave.

2.1.2 Diagnóstico da NF1

Em aproximadamente 95% dos pacientes o diagnóstico clínico de NF1 é firmado até os 11 anos de idade (MESSIAEN et al, 2000; FRIEDMAN, 2011). Os critérios para o diagnóstico clínico (Tabela 2) foram estabelecidos pelo National Institutes of Health (NIH), e para o diagnóstico é necessário que se tenha pelo menos dois dos sete critérios (National Institute of Health (NIH), Consensus Development Conference, 1988). Nos casos em que o diagnóstico clínico não é tão óbvio ou há achados discrepantes, em que se suspeita de outros diagnósticos, o teste molecular torna-se útil. Cerca de 50% das mutações são *de novo* e nestes casos o risco de recorrência é de 1% para os irmãos do probando se os pais não forem afetados, pois há a possibilidade de mosaicismos germinativo nos pais. Indivíduos que apresentam mosaicismos somáticos para uma mutação no gene *NF1* apresentam neurofibromatose segmentar (RICCARDI & EICHNER, 1986; ELEFTERIOU et al, 2009; BOYD et al, 2009).

Tabela 2 - Critérios diagnósticos para neurofibromatose tipo 1 pelo National Institute of Health (NIH), Consensus Development Conference, 1988*:

1. Seis ou mais manchas café-com-leite iguais ou maiores do que 5mm no maior diâmetro em pré-pubescentes ou 15mm após a puberdade;
2. Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um plexiforme;
3. Efélides axilares ou inguinais;
4. Glioma de via óptica;
5. Dois ou mais Nódulos de Lisch;
6. Displasia da asa do esfenoide ou afilamento da região cortical de osso longo com ou sem pseudoartrose; e
7. Familiar de primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) com NF1 por estes critérios.

*São necessários dois ou mais dos sete critérios para diagnóstico clínico de NF1.

Fonte: modificado de National Institute of Health Consensus development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda. 1988.

2.2 VITAMINA D

A vitamina D é lipossolúvel e considerada um hormônio esteroide. A forma ativa da vitamina D pode ser produzida principalmente a partir da via endógena (Figura 6) em que o 7-desidrocolesterol localizado na pele é transformado em colecalciferol (vitamina D₃) pela ação de raios ultravioleta B (290 a 315nm) através de termo-reação. A exposição excessiva à radiação ultravioleta B (UVB) não causa intoxicação por vitamina D, pois ela mesma leva à degradação do 7-desidrocolesterol e do colecalciferol (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006a; HOLICK, 2007).

A outra via para produção de vitamina D é a exógena (Figura 6) e ocorre pela ingestão de precursores encontrados em certos alimentos, como peixes de mares profundos (vitamina D₃), alguns grãos e plantas (ergosterol, vitamina D₂) e gema de ovo (vitaminas D₂ e D₃) que são absorvidos via intestinal e incorporados aos quilomicrons para serem transportados pelo sistema linfático até a circulação venosa (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006a; HOLICK, 2007).

Cerca de 80% da vitamina D ativa provem da via endógena, o que é dependente da exposição solar e do nível cutâneo de pigmentação melanocítica, e apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação. Essas características diferenciam a vitamina D da maioria das demais vitaminas cuja principal fonte é a dieta (HUOTARI & HERZIG, 2008).

Tanto o colecalciferol quanto o ergosterol são transportados no plasma pela proteína ligadora de vitamina D até o fígado, onde são convertidos em 25-hidroxicolecalciferol [25-(OH)D] pela ação da 25-hidroxilase. Após, nos túbulos contorcidos proximais renais, a 1-alfa-hidroxilase transforma o 25-hidroxicolecalciferol em 1,25-diidroxicolecalciferol [1,25(OH)₂D], que é a forma ativa da vitamina D. A 25-hidroxivitamina D-1-alfa-hidroxilase está presente na maioria dos tecidos, como nervoso, mamário, prostático, imune e colônico, que possuem também o Receptor de Vitamina D (VDR) ao qual se liga a 1,25(OH)₂D. No rim também pode ser

produzida uma forma menos ativa da vitamina D, 24,25-diidroxicolecalciferol, pela ação da 24-hidroxilase (DEEB et al, 2007).

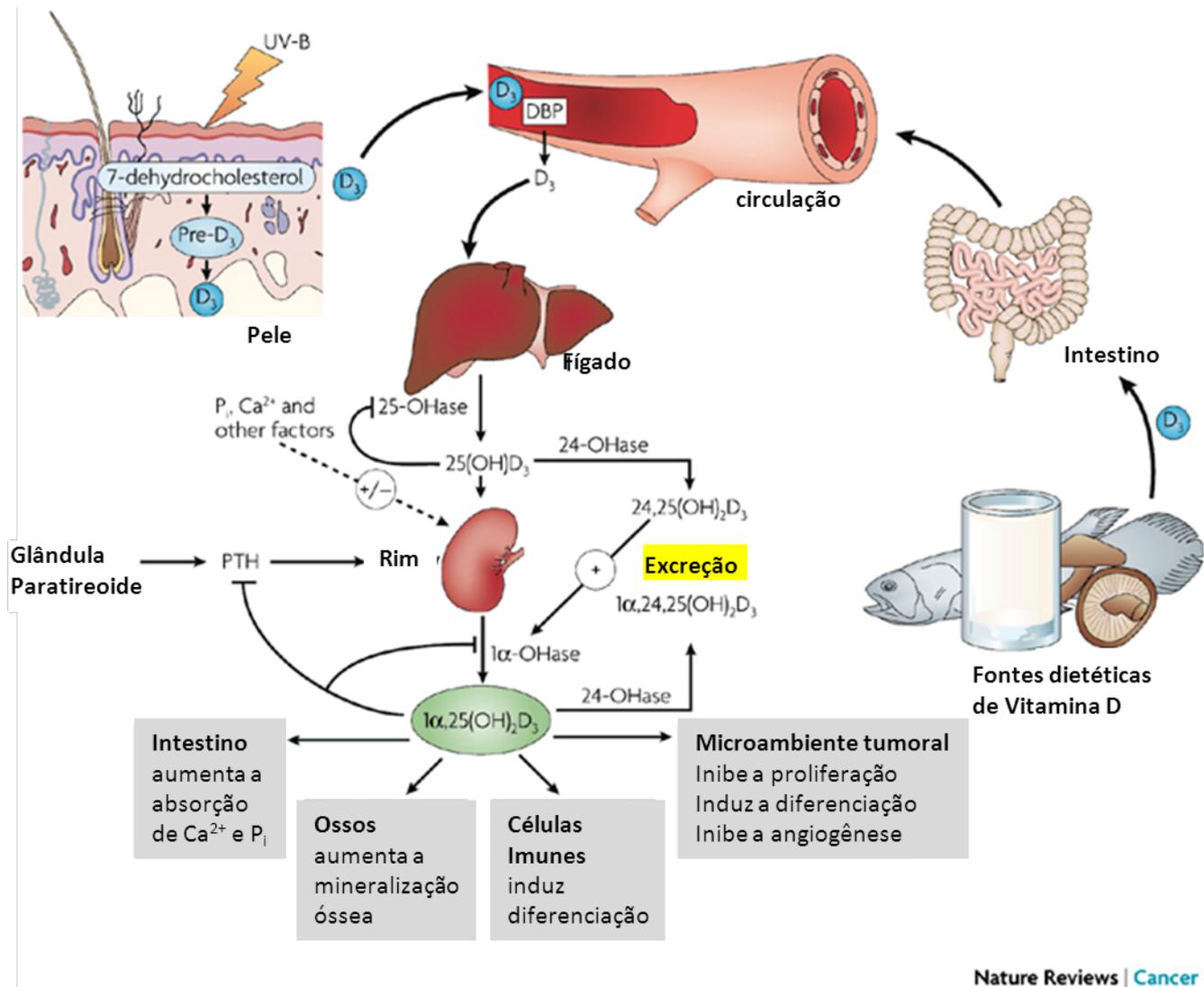


Figura 6 - Metabolismo da Vitamina D*.
Fonte: modificada de DEEB et al, 2007.

Após exercer seu efeito nos tecidos, a 1,25(OH)₂D é degradada pelo estímulo da expressão do gene *CYP24* de forma a não entrar na corrente sanguínea e interferir no metabolismo do cálcio (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006a; HOLICK, 2007).

A produção da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é regulada pelos níveis de paratormônio (PTH), cálcio, fósforo e fator de crescimento de fibroblasto 23 (Figura 7). A principal ação da vitamina D é manter os níveis de cálcio ionizado e de fosfato normais no plasma. A hipocalcemia e a hipofosfatemia levam a um aumento da atividade da enzima 1-alfa-hidroxilase, a primeira por aumento da secreção de PTH e a segunda diretamente. A vitamina D estimula a reabsorção intestinal de cálcio e fósforo, colabora com o PTH na mobilização do cálcio ósseo e estimula a reabsorção de cálcio nos túbulos renais distais PTH-dependentes. A vitamina D age também na mineralização óssea, embora o mecanismo ainda não esteja completamente esclarecido. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se liga ao complexo receptor de vitamina D (VDR) e realiza *feedback* negativo, diminuindo a atividade da 1-alfa-hidroxilase e a secreção de PTH. Logo, o aumento dos precursores de vitamina D resulta no acúmulo de $25(\text{OH})\text{D}$ no fígado e no tecido adiposo, aumenta a produção de 24,25-diidroxicolecalciferol pela ação da 24-hidroxilase e aumenta a absorção intestinal de cálcio. Nos períodos de menor produção de vitamina D, como no inverno, a $25(\text{OH})\text{D}$ é mobilizada e transformada em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006a; HOLICK, 2007).

Quando os níveis de cálcio estão baixos, a $25(\text{OH})\text{D}$ através da estimulação de VDR induz ao aumento da expressão do ligante NF-kB (RANKL) na membrana plasmática do osteoblasto. Este, por sua vez, irá se ligar ao RANK na membrana plasmática dos preosteoclastos, o que induz a sua diferenciação em osteoclastos maduros capazes de aumentas a reabsorção óssea (KHOSLA, 2001; HOLICK, 2006a).

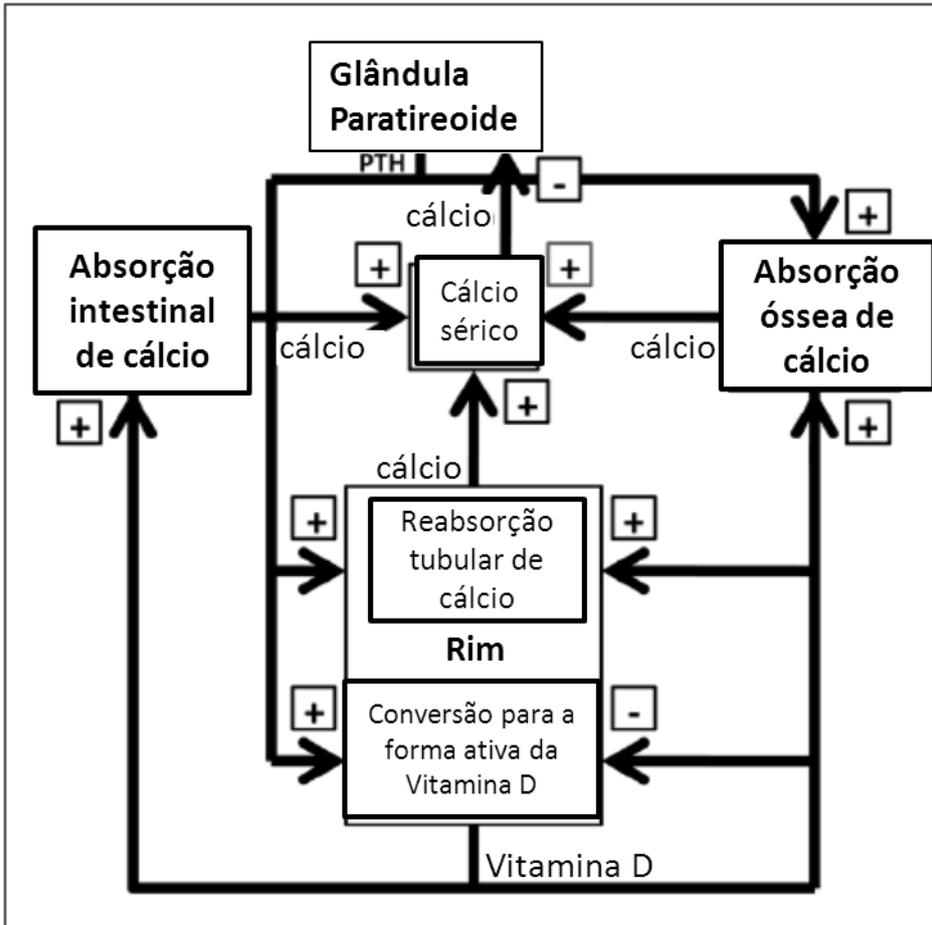


Figura 7 - Ações do paratormônio e da vitamina D.

Fonte: modificado de LANDRY et al, 2011.

Para avaliação dos níveis séricos de vitamina D, geralmente utilizamos a dosagem dos níveis de 25(OH)D no soro, pois apresenta boa correlação com os achados de osteomalácia e raquitismo, embora a forma ativa final seja a 1,25-hidroxivitamina D. A 1,25-hidroxivitamina D pode estar em níveis normais em pacientes que apresentem osteomalácia leve ou moderada, pois quando ocorre insuficiência ou deficiência de vitamina D há aumento dos níveis de PTH, o que resulta na maior conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D, acentuando ainda mais a deficiência de vitamina D. Adicionalmente, a 1,25(OH)₂D tem meia-vida menor, e a concentração no sangue não corresponde a sua produção celular, principalmente em células renais. A meia-vida de 25(OH)D é de duas a três semanas. Por esse motivo, o ideal é dosar a vitamina D na primavera, quando o estoque hepático já foi utilizado, uma vez que durante o inverno a pessoa se expõe menos a radiações UVB (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006b; HOLICK, 2007).

Vários estudos sugerem que a vitamina D apresenta efeitos regulatórios em centenas de genes (WANG et al, 2005; NAGPAL et al, 2005; HOLICK, 2006a). Além de estar envolvida no metabolismo do cálcio e fósforo, a vitamina D também apresenta funções não-esqueléticas como: regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese (NAGPAL et al, 2005). Ela é capaz de diminuir a proliferação celular (por regulação dos genes p21 e p27) tanto em células normais quanto em células cancerosas e induzir a diferenciação celular terminal (Figura 6). Esta seria a possível explicação para a diminuição do risco de óbito em pacientes com câncer quando apresentam níveis mais elevados de 25(OH)D e maior exposição solar (HOLLIS, 2005).

A deficiência de vitamina D causa raquitismo em crianças (quando as epífises ainda estão abertas) e osteomalácia nos adultos, além de maior risco para fraturas, fraqueza muscular, exacerbação da osteopenia e osteoporose. A deficiência pode resultar da síntese inadequada de 7-desidrocolesterol, pela pouca exposição aos raios UVB, deficiência dietética de vitamina D, diminuição na absorção de vitamina D lipossolúvel, distúrbios no metabolismo da vitamina D, resistência de órgãos alvo ao 1,25-(OH)₂D ou depleção de fosfato. (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2006b; HOLICK, 2007). Há interferência nos níveis séricos de vitamina D em pessoas em uso de complementos alimentares (aumento) e de alguns medicamentos (diminuição), assim como em pessoas que apresentem alguma doença que afeta o trato gastrointestinal, fígado, rins, paratireóides e pele, ou em pessoas tabagistas e etilistas (Tabela 3). A falta de exposição solar, assim como a cor da pele mais escura, também está associada à maior incidência de hipovitaminose D (HOLICK, 2007; DIXON et al, 2007).

Para classificação da cor da pele utilizamos a classificação de Fitzpatrick: Tipo I - Pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia; Tipo II - Pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia; Tipo III - Pele menos clara, algumas vezes queima e sempre bronzeia; Tipo IV - Pele morena clara, raramente queima e sempre bronzeia; Tipo V - Pele morena escura, nunca queima e sempre bronzeia; e Tipo VI - Pele negra, nunca queima e sempre bronzeia (FITZPATRICK, 1988).

Tabela 3 Causas de deficiência de vitamina D.**Redução da síntese cutânea:**

- Uso de protetor solar;
- Hiperpigmentação cutânea;
- Envelhecimento;
- Estação climática, latitude e horário do dia em que ocorre a exposição solar; e
- Enxertos por queimadura de pele.

Redução da biodisponibilidade:

- Má absorção intestinal (redução da absorção de gorduras):
Por doenças como fibrose cística, doença de Crohn, doença celíaca, doença de Whipple, desvio cirúrgico do trato digestivo e pancreatite crônica; e pelo uso de fármacos que reduzem a absorção de colesterol.

- Obesidade.

Aumento da catabolismo:

- Anticonvulsivantes;
- Glicocorticóides;
- Esquema HAART para tratamento de SIDA; e
- Medicamentos anti-rejeição.

Amamentação:

- Leite materno é pobre em vitamina D.

Diminuição da síntese de 25(OH)D:

- Hepatopatia crônica.

Aumento da perda urinária de 25(OH)D:

- Síndrome nefrótica.

Diminuição da síntese de 1,25(OH)₂D:

- Insuficiência renal crônica.

Doenças hereditárias*:

- Raquitismo dependente de vitamina D tipos 1,2 e 3;
- Raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante; e
- Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X.

Doenças adquiridas:

- Osteomalácia induzida por tumores (como Schwannoma);
- Hiperparatireoidismo primário;
- Doenças granulomatosas, sarcoidose, tuberculose e linfomas, entre outras; e
- Hipertireoidismo.

*Existem apenas duas doenças hereditárias localizadas no cromossomo 17q21-q22 que predisõem a raquitismo e osteomalácias, porém estão associadas a alterações hematológicas (anemia hemolítica e acantocitose) e renais (acidose tubular renal) sem correlação com a NF1 (MCKUSICK, 2012).

HAART Terapia anti-retroviral potente; SIDA Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

Fonte: modificado de Holick, 2007.

Diversos estudos mostram que a hipovitaminose D é muito mais frequente do que se esperava, principalmente em países nórdicos e em idosos, tanto pela pouca exposição solar como pela baixa ingestão alimentar de precursores de vitamina D (HOLICK, 2006b). Estudos realizados no Brasil que avaliaram a prevalência de

hipovitaminose D em grupos específicos evidenciaram níveis adequados de 25(OH)D em Recife (8°S) e São Paulo (21°S), hipovitaminose D em 42,4% dos pacientes em Minas Gerais (19°S), porém no Rio Grande do Sul (30°S), provavelmente devido a suas condições climáticas e ao perfil de risco dos pacientes (internados em enfermarias e médicos residentes), se observa uma alta prevalência de hipovitaminose D (MAEDA & LAZARETTI-CASTRO, 2003a; MAEDA et al, 2003b; PREMAOR et al, 2004; PREMAOR & FURLANETTO, 2006; SILVA et al, 2008, PREMAOR et al, 2008; RAIMUNDO et al, 2011). Em um estudo transversal com médicos residentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a média dos níveis séricos de 25(OH)D foi 17.9+/-8.0 ng/mL, e 57.4% dos participantes apresentaram níveis abaixo de 20 ng/ml. (PREMAOR et al, 2008)

Não existe consenso em relação aos níveis ótimos de 25(OH)D, e a maioria dos especialistas utiliza níveis abaixo de 20ng/mL para definir o diagnóstico de deficiência de vitamina D. Os níveis de 25(OH)D são inversamente proporcionais aos níveis de Paratormônio (PTH) até os níveis de 25(OH)D atingirem 30 a 40 ng/mL, quando, então, os níveis de PTH atingem o nadir. Ocorre aumento do transporte de cálcio intestinal até que os níveis de 25(OH)D atinjam 32ng/mL. Dessa forma, níveis de 25(OH)D abaixo de 20ng/mL são considerados deficientes, entre 20 e 30ng/mL insuficientes e acima de 30 ng/mL suficientes para a maioria dos autores. Estes valores são referentes à dosagem das duas formas de vitamina D, ergocalciferol e colecalciferol (LIPS, 2001; DAWSON-HUGHES, 2005; HOLLIS, 2005; WANG, 2005; HOLICK, 2006b; HOLICK, 2007; VIETH et al, 2007; HUOTARI & HERZIG, 2008).

A dosagem de 25(OH)D pode ser feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), radioimensaio (RIA), espectrometria de massa (MS), ensaio imunoenzimático (EIA), ensaio por ligação competitiva à proteína (CBPA), ensaio automático por quimioluminescência ligada à proteína (CLBPA) e imunoensaio quimioluminescente (CLIA). Não é incomum haver discordância entre valores inter-ensaio. O uso da técnica de cromatografia líquida de alta pressão-ionização química em pressão atmosférica-espectrometria de massa (HPLC-APCI-MS) parece fornecer valores maiores, CLIA demonstra resultados com os menores valores e RIA, valores

intermediários. No estudo realizado por Senellman et al, 2010, foram encontradas diferenças de valores interensaios de até 17ng/mL. (SNELLMAN et al, 2010; TACHER & CLARKE, 2011).

O tratamento de hipovitaminose D ainda é tão controverso quanto os próprios níveis séricos de 25(OH)D considerados como normais. Exposição solar dos braços e pernas durante cinco a 30 minutos (dependendo do horário do dia, da estação, da latitude e da pigmentação da pele) entre 10 horas da manhã e três horas da tarde duas vezes por semana parece ser frequentemente adequado (HOLICK, 2006b), porém não é facilmente factível e apresenta o risco da exposição solar, por isso, o uso da vitamina D via oral é mais aceito.

2.3 RECEPTOR DE VITAMINA D

As ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são mediadas pelo receptor da vitamina D (VDR), que é um receptor nuclear e atua como um fator de transcrição dependente de ligante, determinando, desta forma, uma resposta genômica através da regulação da transcrição de alguns genes (Figura 8). O VDR, membro da superfamília de receptores hormonais nucleares, é capaz de se ligar a vários metabólitos da vitamina D, mas sua maior afinidade é pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. A ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR induz mudanças conformacionais que permitem ao VDR formar um heterodímero com o receptor X retinóico (RXR) e também ligar-se a proteínas co-ativadoras transcricionais (como a SCR-1) para que exerça sua função (DELUCA & CANTORNA, 2004; HIBLER et al, 2010).

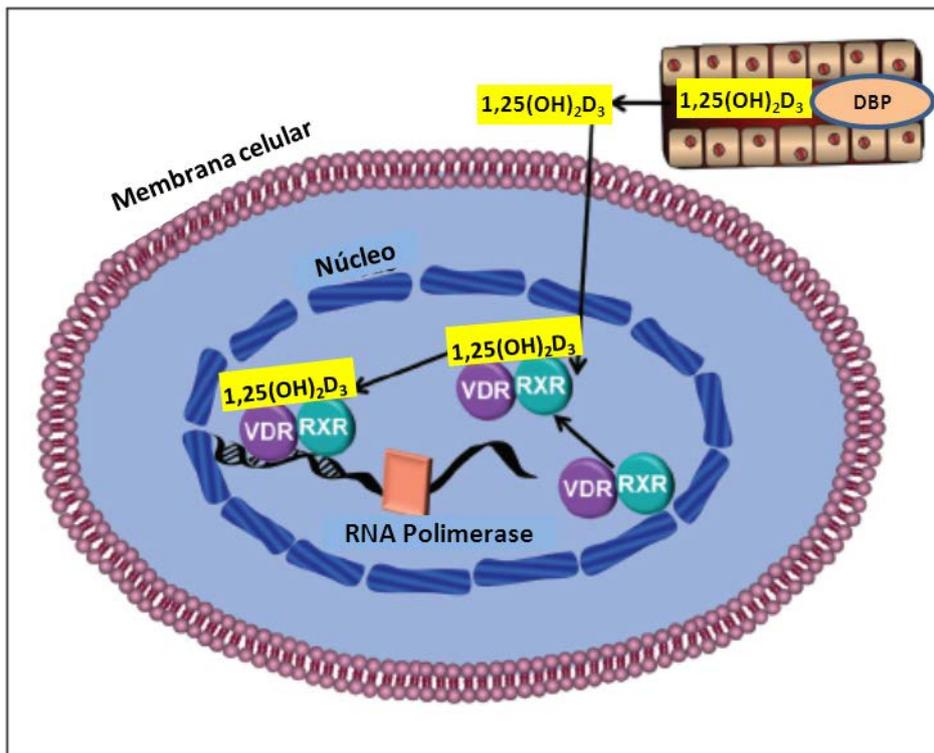


Figura 8 - A interação entre a vitamina D e as células alvo na glândula paratireoide. Após chegar à célula alvo, a 1,25-diidroxi-vitamina D se dissocia da proteína de ligação à vitamina D, entra na célula e interage com o receptor de vitamina D (VDR). O VDR forma heterodímeros com os receptores retinóides (RXR). A ligação da 1,25-diidroxi-vitamina D com o complexo VDR/RXR é seguida da ligação deste complexo com os elementos de resposta à vitamina D, os quais iniciam, então, a transcrição na região promotora dos genes alvo da vitamina D.

Fonte: modificado LANDRY, 2011.

O VDR possui um domínio bem definido para ligação com o ácido desoxirribonucleico (DNA). O heterodímero liga-se a sequências específicas do DNA, também conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (VDRE - *Vitamin D Response Elements*), localizados nas regiões promotoras de genes que são ativados pela vitamina D. Em sequência à ligação ao DNA, há recrutamento de outras proteínas nucleares para o complexo transcricional (Figura 8). O domínio de ligação com a 1,25(OH)₂D ainda não está bem definido (YAMADA et al, 2001).

Especula-se que exista um VDR de membrana celular responsável por ações rápidas da vitamina D, pois justificaria o aumento acelerado na absorção de cálcio pelo enterócito, em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de 1,25(OH)₂D, independente da sua ação genômica (PREMAOR & FURLANETTO, 2006).

2.3.1 Gene do gene do receptor da vitamina D

O gene *VDR* está localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.1. Seis éxons, 1a-1f, estão localizados na região 5'-não codificante (5'UTR). Os éxons 2-9, localizados entre as regiões promotora 5' e 3' não traduzida (5'UTR e 3'UTR), codificam a porção estrutural do produto gênico. O processamento alternativo da região 5'UTR pode gerar uma variedade de ácidos ribonucléicos (RNA) mensageiros diferentes. Estas diferentes isoformas podem ter uma função diferenciada e estar associadas a respostas fisiológicas diferentes (MIYAMOTO et al, 1997; HALSALL et al, 2007).

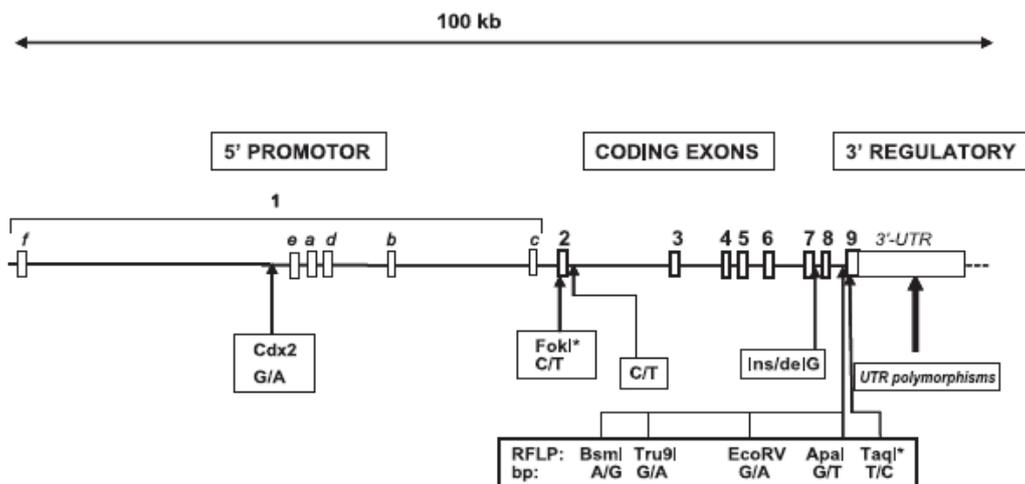


Figura 9: Gene *VDR*, demonstrando os íntrons e éxons e a posição dos quatro polimorfismos mais frequentemente estudados. Os quatro polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no éxon 2 (*FokI*), íntron 8 (*BsmI*, *ApaI*) e éxon 9 (*TaqI*) foram definidos, historicamente, pelas enzimas de restrição associadas. Os genótipos são designados por convenção pela primeira letra do nome da enzima em letra maiúscula, indicando a ausência daquele ponto de clivagem, enquanto em letra minúscula indica a presença do ponto de clivagem.

Fonte: modificado de Uitterlinden, 2004b.

Os éxons 2 e 3 do gene *VDR* estão envolvidos com o domínio de ligação ao DNA, e os éxons 7, 8 e 9 estão envolvidos com o domínio de ligação à vitamina D (HUGHES et al, 1988).

O *VDR* é pleiotrópico, sendo expresso em outros tecidos além do ósseo, renal e intestinal. Ele está presente no sistema imune, trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), glândula mamária, sistema endocrinológico (ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, paratireóide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado (BRAIDMAN & ANDERSON, 1985; DELUCA & CANTORNA, 2001).

2.3.2 Polimorfismos do gene *VDR*:

O gene *VDR* apresenta vários polimorfismos (Figura 9) sem efeito funcional bem conhecido, porém algumas evidências mostram associação com manutenção da estabilidade de seu RNA mensageiro (MORRISON et al, 1994). Os quatro polimorfismos mais frequentemente estudados são polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no: éxon 2 (*FokI*), íntron 8 (*BsmI*, *Apal*) e éxon 9 (*TaqI*). Estes polimorfismos foram definidos e nomeados, historicamente, pelas enzimas de restrição associadas. Os genótipos são designados por convenção pela primeira letra do nome da enzima em letra maiúscula, indicando a ausência daquele ponto de corte, enquanto em letra minúscula indica a presença do ponto de corte. A maioria dos polimorfismos no gene *VDR* foi identificada em regiões regulatórias, o que não determina alterações estruturais, mas pode alterar a expressão gênica (UITTERLINDEN et al, 2002; UITTERLINDEN et al, 2004a; UITTERLINDEN et al, 2004b; VALDIVIELSO & FERNANDEZ, 2006).

O Polimorfismo ***BsmI*** (rs1544410) está localizado no íntron entre os éxons 8 e 9, posição 63980, resulta da substituição adenina-guanina (A-G) (MORRISON et al, 1992). A nomenclatura alélica indica “B” para identificação do alelo com a presença de adenina e “b” para o alelo com a presença de guanina. O polimorfismo ***FokI*** (rs2228570) está localizado na junção do íntron 1 com o éxon 1, na posição 30920, e resulta da substituição citosina por timina, criando um códon de início adicional (ATG) três códons abaixo do início da transcrição. A presença do sítio de clivagem *FokI*, definido como “f” (presença de C), resulta na proteína *VDR* selvagem (427 aminoácidos), com o aminoácido metionina na primeira posição (forma M1). A ausência do sítio de clivagem *FokI*, definido como “F” (presença de T), insere novo sítio de iniciação e leva à tradução a partir deste, resultando em uma proteína

levemente truncada, com três aminoácidos a menos (424 aminoácidos - forma M4) (ARAI et al, 1997; GROSS et al, 1996). As regiões polimórficas definidas como *Apal* e *TaqI* estão localizadas na região 3' do gene. O locus ***Apal*** (rs7975232) é definido pela substituição citosina-adenina (C-A) no íntron 8, na posição 64978. Utilizamos “A” para o alelo com adenina e “a” para o alelo com citosina. O locus ***TaqI*** (rs731236), localizado no éxon 9, na posição 65058, é definido pela substituição silenciosa de timina-citosina (T-C). “T” é utilizado para o alelo com a presença de timina e “t” para o alelo com citosina (FARACO et al, 1989; MORRISON et al, 1994).

Alguns estudos investigaram a extensão do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos. Até o momento, os haplótipos envolvendo polimorfismos *Apal*, *BsmI* e *TaqI* foram bem definidos: baT, BA_t e bAT (MORRISON et al, 1994). O haplótipo baT está ligado com cauda poliA longa, e o haplótipo BA_t está ligado com a cauda poliA curta (MORRISON et al, 1994; UITTERLINDEN et al, 1996; DURRIN et al, 1999; INGLES et al, 1997). As diferenças entre os diferentes grupos étnicos, asiáticos, eurodescendentes e afrodescendentes (Tabelas 4 e 5) podem ser decorrentes provavelmente do processo evolutivo e do comportamento genético das populações (UITTERLINDEN et al, 2006).

Tabela 4 - Prevalência dos alelos polimórficos *FokI* f e *BsmI* B do gene *VDR* em diferentes grupos étnicos.

Polimorfismo	Asiáticos	Eurodescendentes	Afrodescendentes
<i>FokI</i> f (alelo T)	51%	34%	24%
<i>BsmI</i> B (alelo A)	7%	42%	36%

Fonte: dados retirados de Uitterlinden, 2004b.

Tabela 5 - Prevalência de diferentes haplótipos do gene *VDR* em diferentes grupos étnicos incluindo os polimorfismos *Apal*, *BsmI* e *TaqI*.

Origem étnica	Haplótipos		
	baT	BA _t	bAT
Eurodescendentes	43%	39%	11%
Asiáticos	75%	7%	17%
Afrodescendentes	26%	16%	59%

Fonte: dados retirados de Uitterlinden, 2004b.

O polimorfismo *FokI* não mostrou até o momento estar em desequilíbrio de ligação com qualquer outro polimorfismo do gene *VDR* (NEJENTSEV et al, 2004). A proteína curta (alelo *F*) parece ter atividade transcricional maior que a proteína longa (alelo *f*) segundo alguns estudos *in vitro* (ARAI et al, 1997; JURUTKA et al, 2000;

WHITFIELD et al, 2001; COLIN et al, 2000). Em experimentos com transfecção experimental, a presença de F-VDR resultou em maior transcrição de fatores de transcrição imuno-específicos, proliferação de linfócitos e síntese de proteínas por células do sistema imune, apontando para a participação deste polimorfismo na imunorregulação, podendo influenciar nas doenças imuno-mediadas (VAN ETTEN et al, 2007).

Uma metanálise destacou quatro principais estudos relatando associação entre os níveis de 25(OH)D e os polimorfismos do gene *VDR* (MCGRATH et al, 2010). Em um estudo com gêmeos, foram identificados níveis de 25(OH)D de $25,8 \pm 2,2$ ng/mL nos portadores do genótipo homocigoto para a proteína curta do VDR, comparado com $33,3 \pm 1,6$ ng/mL nos portadores dos genótipos heterocigoto e homocigoto para a proteína longa do VDR relacionados ao polimorfismo *FokI* ($P=0,005$) (ORTON et al, 2008). Níveis séricos de 25(OH)D significativamente menores foram associados com genótipo F/F, comparado com genótipo f/f (SMOLDERS et al, 2009). Estudo avaliando o metabolismo ósseo e a massa óssea em 99 adolescentes encontrou níveis de 25(OH)D menores nos pacientes com genótipo F/F, quando comparados àqueles que apresentavam genótipo f/f (ABRAMS et al, 2005). Em contrapartida, outros estudos não evidenciaram associação significativa entre níveis séricos de 25(OH)D e diversos polimorfismos do gene *VDR*, dentre eles *FokI* e *BsmI* (WJST et al, 2006; ENGELMAN et al, 2008; ABBAS et al, 2008). Para definir melhor o papel do polimorfismo *FokI* do gene *VDR* na regulação dos níveis da 25(OH)D, são necessários estudos adicionais.

2.4 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1 E VITAMINA D:

Konishi et al, 1991, publicou um trabalho mostrando que pacientes com NF1 e grave osteomalácia responderam muito bem ao tratamento com vitamina D (KONISHI et al, 1991). Baixa densidade óssea em adultos e crianças de ambos os sexos mostrou-se mais comum do que o esperado em pacientes com NF1 (ILLÉS et al, 2001; KUORILEHTO et al, 2005; LAMMERT et al, 2005, DULAI et al 2007; STEVENSON et al, 2007; YILMAZ et al 2007; BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; DUMAN et al, 2008; TUCKER et al, 2009). Embora a osteoporose seja

causada pela perda da matriz óssea orgânica e não por deficiência da calcificação óssea, como ocorre nos casos de deficiência de vitamina D (raquitismo e osteomalácia), a insuficiência de vitamina D pode contribuir para o desenvolvimento de osteoporose.

Na década de 90, Nakayama et al, publicaram dois estudos que sugeriram a melhora de dois sinais cardinais da NF1, NF e CLS, com o uso de vitamina D tópica. A vitamina D poderia agir melhorando o aspecto das CLS *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais e pessoas com NF1. Tal achado poderia ser justificado pelo efeito anti-inflamatório potente da vitamina D, como já demonstrado em pacientes com psoríase, assim como pelo efeito antiproliferativo através da inibição da transcrição de DNA, como já descrito com o oncogene *c-fos* em camundongos (NAKAYAMA et al, 1997; NAKAYAMA et al, 1999). Adicionalmente, em 2007, Yoshida et al, publicaram um trabalho no qual 8 pacientes com diagnóstico clínico de NF1 foram tratados com luz intensa-radio frequência combinada com vitamina D tópica, apresentando melhora no aspecto das CLS (YOSHIDA, 2007). Baseado nesses trabalhos, Lammert et al, 2006, realizou a dosagem sérica de 25-hidroxivitamina D em 55 pacientes com NF1 e em 58 controles saudáveis. Nesse estudo, a média geométrica da concentração sérica de 25-hidroxivitamina D foi 14,0ng/mL entre os pacientes com NF1, comparado com 31,4ng/mL entre os controles saudáveis ($p < 0,00001$), e a concentração sérica de vitamina D apresentou inclusive correlação inversa altamente significativa com o número de neurofibromas ($p < 0,0003$). Setenta e dois por cento dos pacientes com NF1 apresentaram níveis de vitamina D abaixo de 20ng/mL, contra 21% dos controles (LAMMERT et al, 2006).

Em sequência, outros seis estudos, três na Alemanha, dois nos Estados Unidos da América e um na Itália, evidenciaram níveis mais baixos de 25(OH)D em pessoas com NF1 do que na população geral (BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010; STEVENSON et al, 2011; PETRAMALA et al, 2011). Também foi evidenciado maior risco para osteomalácia (Seitz et al, 2009). Apenas Lammert et al, 2006, encontrou correlação entre o maior número de NF e os níveis mais baixos de 25(OH)D. Stevenson et al, 2011, não encontrou associação entre os níveis de 25(OH)D e gliomas ópticos (LAMMERT et al, 2007; TUCKER et al, 2009;

SEITZ et al, 2010; STEVENSON et al, 2011). A hipovitaminose D, então, poderia estar envolvida de alguma forma na patogenia das alterações ósseas, neurológicas e cutâneas da doença (Tabela 5 do artigo; página 75).

Por fim, níveis de 25(OH)D menores que 20 foram associados a maior incidência de câncer, hipertensão arterial, baixa estatura e fraqueza muscular, que também podem estar presentes na NF1, inclusive em pacientes brasileiros (HOLICK, 2007; SOUZA et al, 2009; FRIEDMAN, 2011; ZHANG & NAUGHTON, 2010).

No caso de pessoas com NF1, existem poucos estudos com número reduzido de pacientes adultos para avaliar a dose de vitamina D nas doses de 400UI a 1000UI por dia, porém a dose de vitamina D para o tratamento de pessoas com hipovitaminose D (insuficiência e deficiência) com e sem diagnóstico de NF1 não está bem estabelecida (SEITZ et al., 2009; e BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; PETRAMALA et al, 2011).

Parece haver uma maior taxa de reabsorção óssea em pessoas com NF1 pelo aumento da expressão de RANKL no osteoblasto, que ocorreria através do aumento da sinalização Ras-MAPK, que é um importante regulador do balanço entre a ação de osteoblastos e de osteoclastos. Esta parece ser a razão para a maior incidência de osteomalácia e osteoporose neste grupo de pacientes (ELEFTERIOU et al, 2006; WADA et al, 2006; SCHINDELER & LITTLE, 2007; CHO et al, 2008).

Com os presentes estudos na literatura não é possível definir o real papel da deficiência de vitamina D na patogênese da NF1, assim como definir os níveis terapêuticos ideais para esse grupo de pacientes. Certamente mais estudos são necessários.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos científicos de caso-controle evidenciaram maior incidência de hipovitaminose D em pacientes com este diagnóstico, inclusive com evidência de maior número de neurofibromas em pacientes com deficiência de 25(OH)D. Os casos de deficiência de vitamina D e também da insuficiência desta vitamina podem estar associados à doença óssea e devem ser corrigidos. Caso se estabelecesse uma associação entre a deficiência de 25(OH)D e o pior fenótipo da doença, a suplementação vitamínica poderia ser uma estratégia factível de tratamento para atenuar os efeitos clínicos e psicológicos da NF1 e da hipovitaminose D.

4 OBJETIVOS

- (1) Determinar o nível de 25-hidroxivitamina D em um grupo de pacientes com diagnóstico clínico de NF1 atendidos nos Ambulatórios de Genética do HCPA e em controles sem o diagnóstico clínico da doença residentes na mesma região geográfica, Rio Grande do Sul, pareados por sexo, idade e tipo de pele pela classificação de Fitzpatrick;
- (2) Correlacionar os principais achados clínicos da NF1, qualitativamente e quantitativamente, com os níveis de vitamina D normais (maiores que 30ng/mL), insuficientes (de 20 a 30ng/mL) e deficientes (abaixo de 20ng/mL); e
- (3) Avaliar a frequência dos polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VRD* em pacientes adultos com diagnóstico clínico de NF1 e verificar se há relação com os níveis de 25(OH)D e com os principais achados da doença.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBAS, S. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R31.

ABLON, J. Gender response to Neurofibromatosis 1. *Soc. Sci. Méd.* 1996; 42(1):99-109.

ABRAMS, S.A. et al. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. *J Bone Miner Res.* 2005 Jun;20(6):945-53.

ARAI, H. et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997 Jun;12(6):915-21.

BOYD, K. P. et al. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol.* 2009 July; 61(1):1-16.

BRUNETTI-PIERRI, N. et al. Generalized Metabolic Bone Disease in Neurofibromatosis Type 1. *Mol Genet Metab.* 2008 May; 94(1):105-111.

BRAIDMAN, I. P; ANDERSON, D. C. Extra-endocrine functions of vitamin D. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1985 Oct;23(4):445-60.

CHO, T. J. et al. Biologic characteristics of fibrous hamartoma from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type 1. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Dec;90(12):2735-44.

CLEMENTI, M. et al. Neurofibromatosis Type 1 Growth Charts. *American Journal of Medical Genetics;* 1999; 87:317-323.

COLIN, E. M. et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Feb;52(2):211-6.

CRAWFORD, A. H; FACS, M. D; SCHORRY, E. K. Neurofibromatosis in Children: The Role of the Orthopaedist. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* July/August 1999. 7(4):217-230.

DAWSON-HUGHES, B. et al. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005 Jul;16(7):713-6.

DEEB, K. K; TRUMP, D. L; JOHNSON, C. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. September 2007; 7:684-700.

DELUCA, H. F; CANTORNA, M. T. Vitamin D: its role and uses in immunology. *The Faseb J*, 2001 Dec;15(14): p. 2579-85.

DIXON, K. M. et al. *In vivo* relevance for photoprotection by the vitamin D rapid response pathway. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2007. 103:451-456.

DULAI, S. et al. Decreased bone mineral density in neurofibromatosis type 1: results from a pediatric cohort. *J Pediatr Orthop*. 2007;27:472-5

DUMAN, O. et al. Bone metabolism markers and bone mineral density in children with neurofibromatosis type-1. *Brain Dev*. 2008;30:584-8

DURRIN, L. K. et al. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Mar 30;1453(3):311-20.

ELEFTERIOU, F. et al. ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasias. *Cell Metab*. 2006 Dec;4(6):441-51.

ELEFTERIOU, F. et al. Skeletal Abnormalities in Neurofibromatosis Type 1: Approaches to Therapeutic Options. *American Journal of Medical Genetics*. July 2009. (4):2327-2338.

ENGELMAN, C. D. et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3381-8.

FARACO, J. H. et al. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1989 Mar 11;17(5):2150.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.

FERNER, R. E. et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 2007; 44:81-88.

FRIEDMAN, J. M. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *AM J Med Genet*. 1999. 89:1-6.

FRIEDMAN, J. M. Neurofibromatosis 1. GeneReviews Edited by Roberta A Pagon. Editor-in-chief Thomas D Bird, Cynthia R Dolan, and Karen Stephens. Copyright © 1993-2011. University of Washington Seattle. Last update: June 2, 2009. Acesso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1109/>. Data: December 20, 2011.

GROSS, C. et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.* 1996 Dec;11(12):1850-5.

HALSALL, J. H. et al. In silico analysis of the 5' region of the vitamin D receptor gene: functional implications of evolutionary conservation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):352-6. Epub 2007 Jan 19.

HERSH, J. H; and the COMMITTEE ON GENETICS. Health supervision for children with neurofibromatosis. *PEDIATRICS.* March 2008. 121(3):633-642.

HIBLER, E. A. et al. Association between polymorphic variation in VDR and RXRA and circulating levels of vitamin D metabolites. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 2010 July;121(1-2):438-441.

HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006a; 116:2062-72.

HOLICK, M. F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006b Mar;81(3):353-73.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* Jul 2007;357(3):266-81.

HOLLIS, B. W. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency; implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr.* 2005 Feb;135(2):317-22.

HUGHES, M. R. et al. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 242: 1702-1705, 1988.

HUOTARI, A; HERZIG, K. H. Vitamin D and living in northern latitudes--an endemic risk area for vitamin D deficiency. *Int J Circumpolar Health.* 2008 Jun;67(2-3):164-78.

ILLÉS, T. et al. Decreased bone mineral density in neurofibromatosis-1 patients with spinal deformities. *Osteoporos Int.* 2001;12(10):823-7.

INGLES, S. A. et al. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Feb;6(2):93-8.

JETT, K; FRIEDMAN, J. M. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med*. Jan 2010;12(1):1-11.

JURUTKA, P. W. et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000 Mar;14(3):401-20.

KLUWE, L. et al. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum Mutat*. 2004;23:111–6

KONISHI, K. et al. Hypophosphatemic osteomalacia in Von Recklinghausen neurofibromatosis. *Am J Med Sci*. 1991 May;301(5):322-8.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050-5.

KUORILEHTO, T. et al. Decreased bone mineral density and content in neurofibromatosis type 1: lowest local values are located in the load-carrying parts of the body. *Osteoporos Int*. 2005;16:928–36.

LAMMERT, M. et al. Decreased bone mineral density in patients with neurofibromatosis 1. *Osteoporos Int*. 2005;16:1161–6.

LAMMERT, M. et al. Vitamin D deficiency associated with number of neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet*. Mar 2006;43:810-813.

LANDRY, C. S. et al. Vitamin D receptors and parathyroid glands. *Endocr Pract*. 2011;17(1):63-68.

LE, L. Q; PARADA, L. F. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type 1: connecting the GAPs. *Oncogene*. 2007 July 12; 26(32):4609-4616.

LIMA, F. T. Oncologia Molecular. Parte 3: Oncogenética. Capítulo29:Síndromes de Câncer Hereditário. 29.8. Neurofibromatose tipo I. Editora ATHENEU. Carlos Gil Ferreira e José Cláudio Rocha. 2004. Páginas 342-347.

LIPS, P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*. August 2001;22(4):477-501.

MAEDA SSK, LAZARETTI-CASTRO M. Influência sazonal sobre as concentrações de 25-Hidroxivitamina D em população idosa ativa na cidade de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003a;48:503.

MAEDA SSK, HAYASHI L, PEREIRA RL, LAZARETTI-CASTRO M. Influência dos aspectos ocupacionais e da sazonalidade nas concentrações de 25-Hidroxivitamina

D em população jovem saudável da cidade de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003b;48:501.

MCGRATH, J. J. et al. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jul;121(1-2):471-7.

MESSIAEN, L. M. et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat.* 2000;15:541–55.

MIYAMOTO, K. et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol.* 1997 Jul;11(8):1165-79.

MORRISON, N. A. et al. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 1;89(15):6665-9.

MORRISON, N. A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994 Jan 20;367(6460):284-7.

MCKUSICK, V. A. Online Mendelian Inheritance in Men. Disponível em: <<http://www.omim.org>> Acesso em: Jan 2012.

NAGPAL, S; NA, S; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 Aug;26(5):662-87.

NAKAYAMA, J, et al. Inhibitory effect of a new vitamin D₃ analogue, 22-oxacalcitriol, on the growth of neurofibroma cells xenografted into nude mouse skin *in vivo*. *European Journal of Dermatology.* October/November 1997. 7(7):475-479.

NAKAYAMA, J. et al. Vitamin D₃ analogues improve café au lait spots in patients with Von Recklinghausen's disease: experimental and clinical studies. *European Journal of Dermatology.* April/May 1999. 9(3):202-206.

NEJENTSEV, S. et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum. Mol. Genet.* 2004. 13: 1633–1639.

National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda, Md., EUA, July 13-15, 1987. Neurofibromatosis. 1988;1(3):172-178.

ORTON, S. M. et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):441-7.

PREMAOR, M. O. et al. Hyperparathyroidism secondary to hypovitaminosis D in hypoalbuminemic is less intense than in normoalbuminemic patients: A prevalence study in medical inpatients in southern Brazil. *Endocrine* 2004;24:47-53.

PREMAOR, M. O; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Feb;50(1):25-37.

PREMAOR, M. O. et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest.* 2008 Nov;31(11):991-5.

RAIMUNDO FV, FAULHABER GA, FURLANETTO TW. Evaluating vitamin D status in ill patients. *J ClinOncol.* 2011 Aug 20;29(24):3337-8; author reply 3338-9. Epub 2011 Jul 18. Comment on *J Clin Oncol.* 2011 Apr 20;29(12):1599-606.

RICCARDI, V. M; EICHNER, J. E. Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis. *The Johns Hopkins University Press.*1986.

SCHINDELER A, and LITTLE DG. Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1). *Bone.* 2008 Apr;42(4):616-22. Epub 2007 Nov 28.

SCRIVER, C. R. et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 4 volume set [Hardcover]. Oitava edição. Cap. 39. Gutmann D and Collins F. Neurofibromatosis 1. Pag 880.

SEITZ, S. et al. High bone turnover and accumulation of osteoid in patients with neurofibromatosis 1. *Osteoporos Int* 21:119-127. May 2010

SHARIF, S. et al. Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J Med Genet* March 2007;44:481-484.

SILVA, B. C. C. et al. Prevalência de Deficiência e Insuficiência de Vitamina D e sua Correlação com PTH, Marcadores de Remodelação Óssea e Densidade Mineral Óssea, em Pacientes Ambulatoriais. *Arq Bras Endrocrinol Metab* 2008;52/3.

SOUZA, J. F. et al. Neurofibromatose tipo 1: mais comum e grave do que se imagina. *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(4):394-399.

SMOLDERS, J. et al. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009 Feb 15;207(1-2):117-21.

SNELLMAN, G. et al. Determining vitamin D status: a comparison between commercially available assays. *PLoS ONE* 5(7): e11555. doi:10.1372/journal.pone.0011555. 2010.

STEVENSON, D. A. et al. Bone mineral density in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*. 2007 Jan;150(1):83-8.

STEVENSON, D. A. et al. Pediatric 25-hydroxyvitamin D concentrations in neurofibromatosis type 1. *J Pediatr Endocr Met*. 24(3-4):168-174. 2011.

SZUDEK, J; BIRCH, P; FRIEDMAN, J. M. Growth charts for young children with neurofibromatosis 1 (NF1). *Am J Med Genet*.2000;92:224-8

TROVÓ, A. B; GOLONI-BERTOLLO, E. M; TAJARA, E. H. Neurofibromatose tipo 1. *HB Científica*. Agosto 2002. 9(2):98-110.

THACHER, T. D; CLARKE, M. D. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clinic Proc*. January 2011;86(1):50-60. doi:10.4065/mcp.2010.0567.

TUCKER, T. et al. Bone health and fracture rate in individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 46:259-265. December 2009.

UITTERLINDEN, AG et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res*. 1996 Sep;11(9):1241-8.

UITTERLINDEN, A. G. et al. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002 197:15-21.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004a May;89-90(1-5):187-93.

UITTERLINDEN, A. G. et al., *Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms*. *Gene*, 2004b. Sep 1;338(2):143-56.

UITTERLINDEN, A. G. et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2006 Aug 15;145(4):255-64.

UPADHYAYA, M. et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2007;80:140-51.

VALDIVIELSO, J. M; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):1-12.

VAN ETTEN, E. et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*. 2007 Feb;37(2):395-405.

VIETH, R. et al. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am J Clin Nutr*. 2007 Mar;85(3):649-50.

YAMADA, S. et al. Three-dimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):177-87.

YILMAZ, K. et al. Bone mineral density in children with neurofibromatosis 1. *Acta Paediatr.*2007;96:1220–2.

YOSHIDA, Y. et al. Treatment of pigmented lesions of neurofibromatosis 1 with intense pulsed-radio frequency in combination with topical application of vitamin D₃ ointment. *Journal of Dermatology*. 2007. 34:227-230.

WADA, T. et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25. Epub 2005 Dec 13.

WANG, T. T. et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. *Mol Endocrinol*. 2005 Nov;19(11):2685-95.

WALKER, L. et al. A prospective study of neurofibromatosis type I cancer incidence in the UK. *British Journal of Cancer*. June 2006; 95:233-238.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. Capítulo7: Genes Supressores de Tumores. Editora Artmed. 2008. Páginas 233-235.

WILLIAMS, V. C. et al. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *PEDIATRICS*. January 2009. 123(1): 124-133.

WHITFIELD, G. K. et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 May 25;177(1-2):145-59.

WJST, M. et al. Asthma Simon KC, Munger KL, Xing Y, Ascherio A. Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. Feb;16(2):133-8.

ZHANG, R; NAUGHTON, D. P. Vitamin D en health and disease: current perspective. *Nutr. J*. December 8, 2010; 9:65

6 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIENTÍFICA *Genetics and Molecular Biology*

Vitamin D deficiency is not more frequent in NF1: a case-control study from Brazil

Larissa Souza Mario Bueno¹⁻⁴, Ernestina Aguiar¹, Fernando de Souza Pereira¹, Patrícia Izetti Ribeiro^{1,2}, Rosana Scalco⁵, Camila Matzenbacher Bittar², Cristina Brickmann Oliveira Netto⁶, Guilherme Gischkow Rucatti^{7,8}, José Artur Chies^{7,8}, Suzi Alves Camey⁹, Patricia Ashton-Prolla^{1, 2,6,7}.

¹ Laboratório de Medicina Genômica – Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Universidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo,,Brazil

⁴ Hospital Metropolitano, Serra, Espírito Santo,,Brazil

⁵ Laboratório de Patologia Clínica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁶ Serviço de Genética Médica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷ Departamento de Genética - UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁸ Laboratório de Imunogenética - UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁹ Departamento de Matemática - UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Key words: Neurofibromatosis type 1, vitamin D, *VDR* Gene Polymorphisms

(*) Correspondence to:

Patricia Ashton-Prolla. MD. PhD

Serviço de Genética Médica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350. CEP: 90035-903 - Porto Alegre - RS. Brazil.

e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br. Tel/Fax.: + 55 51 3359 8011

Abstract:

Introduction: Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disorder caused by mutations in the NF1 gene (17q11.2, neurofibromin). The estimated incidence is approximately 1:3500 newborns and clinical diagnosis is possible in the majority cases. A few studies suggest that patients with NF1 are more likely to have vitamin D deficiency when compared to the general population. **Objectives:** The goal of the study was to determine the levels of 25-OH-vitamin D [25(OH)D] in individuals with NF1 and disease-unaffected controls and analyze *BsmI* and *FokI* *VDR* gene polymorphisms to verify whether genic and allelic frequencies were associated with lower vitamin D levels. **Methods:** Case-control study that included 45 NF1 patients from Southern Brazil and 45 healthy controls matched by sex, skin type and age to the cases. **Results and conclusions:** Overall, 70 (77.8%) of the individuals studied had levels of 25(OH)D below 30ng/mL: vitamin D deficiency was observed in 28 (31.1%) and vitamin D insufficiency in 42 (46.6%) subjects. 25(OH)D deficiency or insufficiency were not more frequent in NF1 patients than in controls ($p=0,074$). We did not observe an association of *VDR* gene polymorphisms and vitamin D levels suggesting that the insufficient or deficient biochemical phenotypes in the patients studied here are not associated with these genetic variants.

Introduction:

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disease caused by mutations in the *NF1* gene, mapped at chromosome 17q11.2, which produces an ubiquitous protein called neurofibromin. NF1 is a cancer predisposition disease with variable expressivity whose main features involve the skin, bone and central nervous system. Approximately one-half of the cases are familial and the remainder is caused by de novo mutations in the *NF1* gene. The estimated incidence of the disease is 1 in 2.500-3.500 live births, independent of gender and ethnic background. (RICCARDI & EICHNER. 1986; TROVÓ et al, 2002; FERNER et al, 2007; HERSH et al, 2008; WILLIAMS et al, 2009)

The diagnosis of NF1 is usually clinical and most of the affected individuals are identified in infancy or childhood. The diagnosis is usually made when at least two of the National Institute of Health (NIH) Diagnostic Criteria for NF1 (National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis, 1988) are met. These include: (1) six or more Café-au-lait spots (CLS) (> 5mm in children and > 15mm in adults); (2) two or more neurofibromas of any type or one plexiform neurofibroma; (3) freckling in the axillary or inguinal regions; (4) optic glioma; (5) two or more hamartomas of the iris (Lisch nodules); (6) skeletal lesions such as sphenoid dysplasia or thinning of the long bone cortex with or without pseudoarthrosis; and (7) a first-degree relative (parent, sibling, or offspring) with NF1.

In addition to the classical signs and symptoms, NF1 patients are prone to osteomalacia, osteopenia, and osteoporosis of unknown etiology (CRAWFORD et al, 1999; LAMMERT et al, 2005; BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; ELEFTERIOU et al, 2009; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010; PETRAMELA et al, 2011). In light of these symptoms, a few studies have suggested that NF1 patients are more commonly diagnosed with hypovitaminosis D when compared to the general population (LAMMERT et al, 2006; BRUNETTI-PIERRI, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010; STEVENSON et al. 2011; PETRAMALA et al, 2011). Lammert et al (2006) even found an inverse relationship between vitamin D levels and number of neurofibromas in NF1 patients, suggesting that vitamin deficiency could be associated with a more severe phenotype. Hypovitaminosis D might indeed be

involved in the pathogenesis of bone, neurological and skin disorders of NF1, since it has a significant role in calcium homeostasis and bone metabolism but it is also involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, apoptosis and angiogenesis. In this line, there is consistent evidence in favor of a role for Vitamin D in the expression of genes related to decreased cell proliferation for both normal and cancer cells and induction of terminal cell differentiation (HOLLIS, 2005; NAGPAL & RATHNACHALAM et al, 2005; WANG et al, 2005; HOLICK,2007; TRACHER & CLARCKE, 2011).

Ultraviolet B light photoisomerizes provitamin D to vitamin D in the skin that is transported to the liver where it is hydrolysed by 25-vitamin-D hydroxylase to 25-hydroxy-vitamin-D [25(OH)D]. Further hydroxylation of 25(OH)D to 1.25-dihydroxy-vitamin D [1.25(OH)2D], the physiologically active form of vitamin D, occurs mainly in the kidney. 1.25(OH)2D exerts its biological effects through binding to the vitamin D receptor (VDR), a nuclear receptor that acts as a transcription factor. When the levels of calcium are low, osteoblasts express the NF- κ B ligand (RANKL) in their plasma membrane through the stimulation of the VDR. This in turn links RANK to the plasma membrane of preosteoclasts and induces their differentiation in functional osteoclasts (KHOSLA, 2001; HOLICK, 2006a). There are several polymorphisms in the VDR gene that may affect receptor function, and the *FokI* and *BsmI* polymorphisms are among the most common ones described. The *BsmI* polymorphism does not alter the protein structure, but affects the stability of VDR mRNA, while the *FokI* polymorphism leads to formation of a smaller protein. Although the exact biological basis remains unclear, some studies have shown a relationship between VDR polymorphisms and bone mineral density, serum 25(OH)D levels, as well as neoplastic and immune diseases. (UITTERLINDEN et al, 2004a, 2004b, 2006; VALDIVIELSO & FERNANDEZ, 2006; VAN ETEN et al, 2007; MCGRATH, et al, 2010; ZHANG & NAUGHTON, 2010).

In the clinic, 25(OH)D levels are used to assess vitamin D status since 1.25(OH)2D usually reflects serum calcium better than total vitamin D content. Several factors interfere with serum vitamin D levels such as age, sun exposure, skin type (Fitzpatrick classification; FITZPATRICK, 1988) and disorders that interfere with vitamin D metabolism (hepatic, kidney and intestinal disease). Prolonged vitamin D

deficiency causes osteomalacia in adults and rickets in children. Nutritional rickets due to Vitamin D deficiency is now rare except in populations with unusually low sun exposure and lack of vitamin D in fortified foods. Vitamin D insufficiency is associated with osteoporosis, bone fractures, decreased immune function, bone pain, muscle weakness and possibly with propensity to cancer and cardiovascular disease (LIPS, 2001; HOLLIS, 2005; HOLICK, 2007; TRACHER & CLARCKE, 2011).

The goal of this study was to assess and compare 25(OH)D levels in a group of 45 patients with the clinical diagnosis of NF1 and in 45 sex-, skin type- and age-matched controls. In addition, we sought to correlate clinical features of NF1 with serum vitamin D levels and analysed *FokI* and *BsmI* polymorphisms in the *VDR* gene to verify if those were associated with hypovitaminosis D and the NF1 phenotype.

Materials and Methods:

Patients and controls. A consecutive series of NF1 patients seen at the genetics outpatient clinics of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Southern Brazil (30° 2' 0" South. 51° 12' 0" West) from November 18th to December 20th, 2009 were invited to participate in this study and enrolled after signature of informed consent. The study was approved by the Institutional Research and Ethics Committees. The minimum number of patients and controls to be enrolled was estimated at 22 in each group and was done using Winpepi version 9.2 based on the findings of Lammert et al (2006) with a power of 90% and an $\alpha=0.05$. Considering the possibility of differences in sun exposure between individuals from this study (recruited in the spring in Southern Brazil) and those of other studies (recruited in Germany during the winter, spring or summer) and in order to have sufficient patients to allow clinical correlations, we set the group sizes at 45 individuals each. The group of cases consisted of adult individuals (above age 18 years) diagnosed with NF1 according to the Criteria of the Consensus Development Conference (National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. 1988). Controls were recruited from among the companions of patients seen in the same genetics clinics and were matched to cases by sex, type of skin and age (allowing a difference of ± 5 years at the most). Exclusion criteria for both groups were age < 18 years, incapacity to provide informed consent, vitamin D supplementation within the last 6

months, diagnosis of gastrointestinal, skin, liver, kidney or parathyroid disease, use of medication that could interfere with the vitamin D metabolism, known vitamin D deficiency and hospitalization in the previous 2 months. In addition, we clinically excluded NF1 patients who met criteria for other genetic disorders such as Noonan Syndrome and segmental NF1 and controls with 1st, 2nd or 3rd degree family history of NF1.

Clinical evaluation: Data on clinical presentation was obtained from chart review and full physical examination was performed on all participants. Family history was assessed and registered in pedigrees in all participants. Diagnostic procedures were done when clinically indicated for the patients. In all participants, the clinical assessment was performed before vitamin D testing by the same clinical geneticist.

Vitamin D Status: In order to limit the effect of seasonal fluctuations of vitamin D photosynthesis, patients were recruited in the spring between the dates previously described. Fasting (minimum 4 hours) peripheral blood samples were collected in EDTA and the plasma isolated by centrifugation was frozen within one hour of collection at -80°C for posterior analysis. All samples were analyzed simultaneously after a storage period of five months. Plasma 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence using the LIAISON commercial kit (DiaSorin Inc. Stillwater/MN.CV 6% intra-assay). Samples were scored as Vitamin D deficient when 25(OH)D results were <20ng/ml. The normal cutoff for 25(OH)D levels was defined at >30ng/ml. Plasma levels between 20 and 30 ng/ml were classified at the insufficiency status.

VDR Genotyping: Genomic DNA from NF1 patients was extracted from leukocytes by conventional salting-out methods. Analysis of the *BsmI* (rs1544410; A and G alleles;) and *FokI* (rs2228570. T and C alleles) polymorphisms in the VDR gene was performed by PCR-RFLP in duplicates as described by Mory et al (2009) and Monticielo et al (2012) was blinded for vitamin D status and clinical phenotype. As control group for the genotypic analyses, we used a series of 150 healthy individuals recruited from Porto Alegre and previously tested for the *BsmI* and *FokI* polymorphisms with the same methodology as described above (MONTICIELO et al, 2012) and tested in the same laboratory as the NF1 samples.

Statistical analyses: All analyses were done using the statistical package SPSS version 16.0. For categorical variables we used the Chi-Square and Fisher's Exact Test and for quantitative variables the T-Student Test. A p-Value < 0.05 was considered statistically significant.

Results:

Clinical and demographic features of the patients and controls are summarized in Table 1 and 2. There was no significant difference between groups in age at assessment, sex, skin type (according to the Fitzpatrick classification, avoidance of sun exposure), habit of smoking or use of alcohol. As expected, patients with NF1 had an increased frequency of short stature and had been more often diagnosed with cancer when compared to controls. There was also no significant difference between the mean 25(OH)D levels between groups: 25,25ng/mL ($\pm 8,46$) in patients and 22.79ng/mL ($\pm 6,28$) in controls. Overall, the prevalence of individuals with deficient (<20ng/mL) or insufficient (20 to 30ng/ml) levels of 25(OH)D was high: 31.1% (11 cases and 17 controls) and 46.7% (20 cases and 22 controls), respectively. However, when we categorized 25(OH)D using a cutoff of 30 ng/ml, NF1 patients had more frequently normal 25(OH)D levels than controls. Although this difference did not reach statistical significance, distinct distribution can be further observed in the 25(OH)D levels (ng/ml) histograms depicted in Figure 1. We did not observe a more severe phenotype in NF1 patients with lower 25(OH)D levels (data not shown).

VDR genotyping results of the NF1 patients are depicted in Table 3. Genotypic frequencies of the *BsmI* and *FokI* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. When compared to a subset of healthy, NF1 unaffected individuals recruited at the same hospital as the NF1 patients (as described in Monticelio et al. 2012), allelic and genotypic frequencies encountered in the patients did not differ significantly. In addition, 25(OH)D levels did not differ among patients with the different *BsmI* and *FokI* genotypes (Table 4).

Discussion

So far, six studies assessed 25(OH)D levels in patients diagnosed with NF1 (Table 5). Among these, five were case-control studies and one a descriptive study, all undertaken in the Northern Hemisphere (USA and Europe). Although biologically plausible, the association of the NF1 with vitamin D deficiency remains controversial and has not been clearly demonstrated in all studies. In fact, only one group (LAMMERT et al, 2006) described an inverse association between increased number of neurofibromas and low plasma 25(OH)D levels, suggesting an effect of the vitamin levels on disease expression. Against this hypothesis, Stevenson and colleagues (2011), found no association between levels of 25(OH)D and the occurrence of optic gliomas or neurofibromas in NF1 patients (LAMMERT et al, 2007; BRUNETTI-PIERRE et al, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010, STEVENSON et al, 2011, PETRAMALA et al, 2011).

In the 90s, Nakayama et al, suggested an improvement of two cardinal signs of NF1, neurofibromas (NF) and cafe-au-lait spots (CLS) in patients treated with vitamin D. In addition, Yoshida et al (2007), published a paper in which eight patients with the clinical diagnosis of NF1 were treated with intense light, radio frequency combined with topical vitamin D, with improvement of the phenotype. Such findings could be explained by the potent antiproliferative effect of vitamin D by inhibiting the transcription specific genes (i.e. c-fos oncogene, as observed in experimental studies with mice) (NAKAYAMA et al, 1997; NAKAYAMA et al, 1999; YOSHIDA et al, 2007).

Finally, Lammert et al (2006) suggested that the lower vitamin D levels observed in NF1 patients relative to controls could be related to less exposure to sunlight in patients with greater visibility of the disease.

Several studies show that vitamin D deficiency is much more frequent than expected mainly in the Nordic countries and in the elderly, both by the low sun exposure and the low dietary intake of vitamin D precursors (HOLICK, 2006; HUOTARI & HERZIG, 2008). This can easily be explained by geographic and cultural aspects of those countries. In Brazil, a country with tropical and sub-tropical climates (depending on the geographic region), adequate 25(OH)D levels have been reported in the general population of the city of Recife (8°S) in the Northeastern region. In the Southeast part of the country, studies are controversial, showing normal 25(OH)D levels in the

population of the State of São Paulo (21°S) but hypovitaminosis D in 42.4% in the population of Minas Gerais (19°S). In the southernmost State of Rio Grande do Sul (30°S), probably due to its climatic conditions and the risk profile of most of the individuals studied to date (hospitalized patients), a high prevalence of hypovitaminosis D has been observed (MAEDA & LAZARETTI-CASTRO, 2003a; MAEDA et al, 2003b; PREMAOR et al, 2004; PREMAOR & FURLANETTO, 2006; SILVA, 2008, PREMAOR, 2008; RAIMUNDO et al, 2011). In a Cross-sectional study with resident physicians of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (the same hospital from which the patients in this study derive), the mean serum levels of 25(OH)D were 17.9+/-8.0 ng/mL and 57.4% of these health care professionals presented 25(OH)D below 20ng/mL (PREMAOR et al, 2008).

The high overall frequency of vitamin D deficiency and insufficiency observed in this study confirms previous reports that studied the population from this region and reinforces that hypovitaminosis D remains a significant health problem even in geographic areas where the population has no obvious restriction to sunlight exposure and adequate nutrition. The reasons why the overall frequency of hypovitaminosis D is so high in this study remain elusive and the lack of an observed difference between NF1 patients and controls may be related to the deficient and insufficient status of a significant proportion of individuals in the community. We can not exclude certain ascertainment biases such as the period of study (collection during the summer could definitively exclude lack of sun exposure as a factor) and sample size. However, the lower 25(OH)D levels consistently observed in controls, both in terms of mean values and distribution of individual 25(OH)D measurements, is against the hypothesis of an association of hypovitaminosis D and NF1. Finally, loss-of-function *VDR* gene polymorphisms *FokI* and *BsmI* were not more common in vitamin D deficient or insufficient NF1 patients suggesting that these biochemical phenotypes are not related to these genetic variants.

Acknowledgements

We would like to thank Carolina Fischinger Moura De Souza, José Miguel Silva Dora, Roberto Giugliani, Rudimar dos Santos Riesgo, and Têmis Maria Félix for their contributions to this study and manuscript preparation. The project was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by grants from CNPq to the investigators.

References

BRUNETTI-PIERRI N, DOTY SB, HICKS J, PHAN K, MENDOZA-LONDONO R, BLAZO M, TRAN A, CARTER S, LEWIS RA, PLON SE, et al. Generalized Metabolic Bone Disease in Neurofibromatosis Type 1. *Mol Genet Metab.* 2008 May; 94(1):105-111.

CHO TJ, SEO JB, LEE HR, YOO WJ, CHUNG CY, CHOI IH. Biologic characteristics of fibrous hamartoma from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type 1. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Dec; 90(12):2735-44.

CLEMENTI M, MILANI S, MAMMI I, BONI S, MONCIOTTI C, TENCONI R. Neurofibromatosis Type 1 Growth Charts. *Am J of Med Gene.* 1999 Dec; 87:317-323.

CRAWFORD, AH; FACS, MD, and SCHORRY, EK. Neurofibromatosis in Children: The Role of the Orthopaedist. *J Am Acad Orthop Surg.* 1999 Jul-Aug. 7(4):217-230.

ELEFTERIOU F, BENSON MD, SOWA H, STARBUCK M, LIU X, ROND, PARADA LF, KARSENTY G. ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasias. *Cell Metab.* 2006 Dec; 4(6):441-51.

ELEFTERIOU F, KOLANCZYK M, SCHINDELER A, VISKOCHIL DH, HOCK JM, SCHORRY EK, CRAWFORD AH, FRIEDMAN JM, LITTLE D, PELTONEN J et al. Skeletal Abnormalities in Neurofibromatosis Type 1: Approaches to Therapeutic Options. *Am J Med Genet.* 2009 July; (4):2327-2338.

FITZPATRICK TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.

FERNER RE, HUSON SM, THOMAS N, MOSS C, WILLSHAW H, EVANS DG, UPADHYAYA M, TOWERS R, GLEESON M, STEIGER C, KIRBY A. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 2007; 44:81-88.

HERSH, JH and the COMMITTEE ON GENETICS. Health supervision for children with neurofibromatosis. *PEDIATRICS*. March 2008. 121(3):633-642.

HOLICK, MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006 Aug;116(8):2062-72.

HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. Jul 2007;357(3):266-81.

HOLLIS, BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency; implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr*. 2005 Feb;135(2):317-22.

HUOTARIA, and HERZIG KH. Vitamin D and living in northern latitudes--an endemic risk area for vitamin D deficiency. *Int J Circumpolar Health*. 2008 Jun;67(2-3):164-78.

KHOSLA S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050-5.

LAMMERT M, KAPPLER M, MAUTNER VF, LAMMERT K, STÖRKEL S, FRIEDMAN JM, ATKINS D. Decreased bone mineral density in patients with neurofibromatosis 1. *Osteoporos Int*. 2005;16:1161-6.

LAMMERT M, FRIEDMAN JM, ROTH HJ, FRIEDRICH RE, KLUWE L, ATKINS D, SCHOOLER T, MAUTNER VF. Vitamin D deficiency associated with number of neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet*. Mar 2006;43:810-813.

LINHARES ER, JONES DA, ROUND JM, EDWARDS RH. Effect of nutrition on vitamin D status: Studies on healthy and poorly nourished Brazilian children. *Am J Clin Nutr* 1984;39:625-30.

LIPS, P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* August 2001;22(4):477-501.

MAEDA SSK, LAZARETTI-CASTRO M. Influência sazonal sobre as concentrações de 25-Hidroxivitamina D em população idosa ativa na cidade de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003a;48:503.

MAEDA SSK, HAYASHI L, PEREIRA RL, LAZARETTI-CASTRO M. Influência dos aspectos ocupacionais e da sazonalidade nas concentrações de 25-Hidroxivitamina D em população jovem saudável da cidade de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003b;48:501.

MCGRATH JJ, SAHA S, BURNE TH, EYLES DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jul;121(1-2):471-7.

MONTICIELO OA, BRENOL JC, CHIES JA, LONGO MG, RUCATTI GG, SCALCO R, XAVIER RM. The role of Bsm1 and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2012 Jan;21(1):43-52. Epub 2011 Oct 12.

MORY DB, Rocco ER, Miranda WL, Kasamatsu T, Crispim F, Dib SA. et al. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and Bsm1 in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. *Hum Immunol.* 2009 Jun;70(6):447-51. Epub 2009 Mar 12.

NAGPAL SNAS, and RATHNACHALAM R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 Aug;26(5):662-87.

NAKAYAMA J, MATSUO S, RIKIHISA W, HORI Y. Inhibitory effect of a new vitamin D3 analogue, 22-oxacalcitriol, on the growth of neurofibroma cells xenografted into nude mouse skin in vivo. *European Journal of Dermatology*. October/November 1997. 7(7):475-479.

NAKAYAMA J, KIRYU H, URABE K, MATSUO S, SHIBATA S, KOGA T, FURUE M. Vitamin D3 analogues improve café au lait spots in patients with Von Recklinghausen's disease: experimental and clinical studies. *Eur J Dermatol*. 1999 April/May. 9(3):202-206.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT: NEUROFIBROMATOSIS. Bethesda, Md., EUA, July 13-15, 1987. *Neurofibromatosis*. 1988;1(3):172-178.

PETRAMALA L, GIUSTINI S, ZINNAMOSCA L, MARINELLI C, COLANGELO L, CILENTI G, FORMICUCCIA MC, D'ERASMO E, CALVIERI S, LETIZIA C. Bone mineral metabolism in patients with neurofibromatosis type 1 (von Recklinghausen disease). *Arch Dermatol Res*. 2011 Nov 27. [Epub ahead of print]. DOI 10.1007/s00403-011-1191-3.

PREMAOR MO, ALVES GV, CROSSETTI LB, FURLANETTO TW.. Hyperparathyroidism secondary to hypovitaminosis D in hypoalbuminemic is less intense than in normoalbuminemic patients: A prevalence study in medical inpatients in southern Brazil. *Endocrine*. 2004 Jun;24:47-53.

PREMAOR MO and FURLANETTO TW. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Feb;50(1):25-37.

PREMAOR MO, PALUDO P, MANICA D, PALUDO AP, ROSSATTO ER, SCALCO R, FURLANETTO TW. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest*. 2008 Nov;31(11):991-5.

RAIMUNDO FV, FAULHABER GA, FURLANETTO TW. Evaluating vitamin D status in ill patients. *J ClinOncol*. 2011 Aug 20;29(24):3337-8; author reply 3338-9. Epub 2011 Jul 18. *Comment on J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1599-606.

RICCARDIVM, and EICHNER JE. Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis. *The Johns Hopkins University Press*.1986.

SEITZ S, SCHNABEL C, BUSSE B, SCHMIDT HU, BEIL FT, FRIEDRICH RE, SCHINKE T, MAUTNER VF, AMLING M. High bone turnover and accumulation of osteoid in patients wit neurofibromatosis 1. *Osteoporos Int*. May 2010;21:119-127.

SILVA BC, CAMARGOS BM, FUJII JB, DIAS EP, SOARES MM. Prevalência de Deficiência e Insuficiência de Vitamina D e sua Correlação com PTH, Marcadores de Remodelação Óssea e Densidade Mineral Óssea, em Pacientes Ambulatoriais. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52/3.

SCHINDELER A, and LITTLE DG.Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1). *Bone*. 2008 Apr;42(4):616-22. Epub 2007 Nov 28.

STEVENSON DA, MOYER-MILEUR LJ, MURRAY M, SLATER H, SHENG X, CAREY JC, DUBE B, VISKOCHIL DH.Bone mineral density in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*. 2007 Jan;150(1):83-8.

STEVENSON DA, VISKOCHIL DH, CAREY JC, SHENG X, MURRAY M, MOYER-MILEUR L, SHELTON J, ROBERTS WL, BUNKER AM, HANSON H, et al. Pediatric 25-hydroxyvitamin D concentrations in neurofibromatosis type 1. *J Pediatr Endocr Met*. 2011Nov;24(3-4):168-174..

TROVÓ AB, GOLONI-BERTOLLO EM,and TAJARA EH. Neurofibromatose tipo 1. *HB Científica*. 2002Agosto;9(2):98-110.

THACHER, TD; and CLARKE, MD. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clinic Proc.* 2011 January;86(1):50-60. doi:10.4065/mcp.2010.0567.

TUCKER T, SCHNABEL C, HARTMANN M, FRIEDRICH RE, FRIELING I, KRUSE HP, MAUTNER VF, FRIEDMAN JM. Bone health and fracture rate in individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* December 2009;46:259-265.

UITTERLINDEN AG, FANG Y, VAN MEURS JB, VAN LEEUWEN H, POLS HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004a May;89-90(1-5):187-93.

UITTERLINDENAG, FANG Y, VAN MEURS JB, POLS HA, VAN LEEUWEN JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene,* 2004b. Sep 1;338(2):143-56.

UITTERLINDEN AG, RALSTON SH, BRANDI ML, CAREY AH, GRINBERG D, LANGDAHL BL, LIPS P, LORENC R, OBERMAYER-PIETSCH B, REEVE J, ET AL. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2006 Aug 15;145(4):255-64.

VALDIVIELSO JM, and FERNANDEZ E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1-2):1-12.

VAN ETTEN E, VERLINDEN L, GIULIETTI A, RAMOS-LOPEZ E, BRANISTEANU DD, FERREIRA GB, OVERBERGH L, VERSTUYF A, BOUILLON R, ROEP BO, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007 Feb;37(2):395-405.

YOSHIDAY, SATO N, FURUMURA M, NAKAYAMA J. Treatment of pigmented lesions of neurofibromatosis 1 with intense pulsed-radio frequency in combination with topical application of vitamin D3 ointment. *Journal of Dermatology.* 2007 Apr. 34:227-230

WADA T, NAKASHIMA T, HIROSHI N, PENNINGER JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25. Epub 2005 Dec 13.

WANG TT, TAVERA-MENDOZA LE, LAPERRIERE D, LIBBY E, MACLEOD NB, NAGAI Y, BOURDEAU V, KONSTORUM A, LALLEMANT B, ZHANG R, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol*. 2005 Nov;19(11):2685-95.

WILLIAMS VC, LUCAS J, BABCOCK MA, GUTMANN DH, KORF B, MARIA BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *PEDIATRICS*. January 2009. 123(1): 124-133.

ZHANG R, and NAUGHTON DP. Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr. J*. 2010 Dec 8;9:65.

Table 1. Clinical and demographic features of NF1 patients and controls included in the study.

Features	NF1 Patients (n=45)		Controls (n=45)		p-value
	N (%)	Media/range (years)	N (%)	Media/range (years)	
Gender					
Female	31 (68.9)		33 (73.3)		0.646 ³
Age		38.6 /18 to 72		36.7 /18.6 to 58.6	
Skintype (Fitzpatrick)					0.129 ⁴
1	1 (2.2)		0		
2	8 (17.8)		12 (26.7)		
3	13 (28.9)		19 (42.2)		
4	5 (11.1)		7 (15.6)		
5	14 (31.1)		5 (11.1)		
6	4 (8.9)		2 (4.4)		
Habit of smoking	6 (13.3)		8 (17.8)		0.722 ³
Use of alcohol *	26 (57.8)		21 (46.7)		0.297 ³
No sun avoidance	39 (86.7)		35 (77.8)		0.275 ³
Previous cancer diagnosis	5 (11.1)		0 (0.0)		0.021 ³
Short stature**	11 (25.5)		3 (6.8)		0.011 ³

¹ socially; ² according to the World Health Organization ($p < 3$) for controls and to Neurofibromatosis 1 Growth Charts for the cases (CLEMENTI et al. 1999), $n = 40$ among cases and $n = 44$ among controls; ³Fisher's Exact Test; ⁴Chi-Square Test

Table 2. Clinical profile of patients with clinical diagnosis of Neurofibromatosis 1 in this study.

Neurofibromatosis 1 Diagnostic Criteria ¹	Presence of the changes / evaluated	%
<i>Cafe-au-lait</i> spots (>1,5 cm)	33/45	73,3
Two or more cutaneous neurofibromas	37/45	82,2
Plexiform Neurofibroma ²	17/45	37,8
Axillary freckling or freckling in inguinal regions	43/45	95,5
Optic Pathway Gliomas	1/45	2,2
Two or more Lisch nodules	20/23 ³	87,0
Sphenoid wing dysplasia	2/30 ⁴	6,7
Pseudoarthrosis	1/45	2,2
First-degree relative with Neurofibromatosis 1	33/44 ⁵	75,0

¹ National Institute of Health Consensus development Conference Statement: Neurofibromatosis. Bethesda, 1988.

² Only cases confirmed by biopsy.

³ twenty-two patients did not attend the appointment with the ophthalmologist for personal reasons.

⁴ Fifteen patients did not attend the performance of the RX for personal reasons, but none had evidence of sphenoid bone dysplasia.

⁵ One person was adopted and unaware of this information.

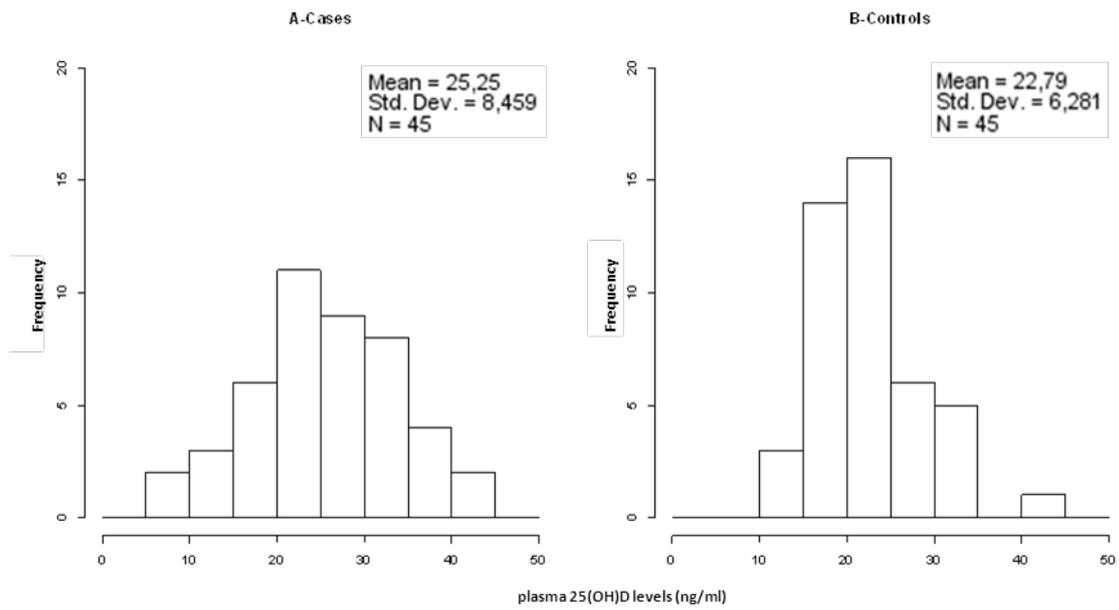


Figure 1: Histograms showing the distribution of plasma 25(OH)D levels (ng/mL) in NF1 patients (A) and controls (B).

Table 3 – *BsmI* (A/G) and *FokI* (C/T) genotypic and allelic frequencies in Neurofibromatosis 1 patients and in unaffected controls.

	Patients(%) N=45	Controls(%) N=150	p value
<i>BsmI</i>			0.284 ¹
AA	4(8.9)	23(15.3)	
AG	27(60.0)	71(47.3)	
GG	14(31.1)	56(37.3)	
<i>BsmI</i>			>0.999 ²
Allele A	35(38.9)	117(39.0)	
Allele G	55(61.1)	183(61.0)	
<i>FokI</i>			0.430 ¹
CC	14(31.1)	63(42.0)	
CT	26(57.8)	73(48.7)	
TT	5(11.1)	14(9.3)	
<i>FokI</i>			0.314 ²
Allele C	36(40.0)	101(33.7)	
Allele T	54(60.0)	199(66.3)	

¹Chi-Square Test; ²Fisher's Exact Test

Table 4 - *VDR* polymorphisms and vitamin D levels in NF 1 patients.

Genotype	25(OH)D (ng/ml)		p value
	<30	≥ 30	
<i>BsmI</i>			0.8875 ¹
AA (n=4)	3 (9.7)	1 (7.1)	
AG (n=27)	19 (61.3)	8 (57.1)	
GG (n=14)	9 (29.0)	5 (35.7)	
<i>FokI</i>			>0.999 ¹
CC (n=14)	10 (32.3)	4 (28.6)	
CT (n=26)	18 (58.1)	8 (57.1)	
TT (n=5)	3 (9.7)	2 (14.3)	

¹Chi-Square Test

25(OH)D – 25-hydroxy-vitamin D

Table 5. Studies that assessed 25(OH)D levels in patients diagnosed with NF1.

Article	Country /latitude	Method for dosing 25(OH)D levels *	Study design	Mean Age years (cases: controls)	Number, (female/ male rate)	25(OH)D levels	Results (p-value)
Lammert et al, 2006	Germany (53° N)	CLBPA no autumn or winter	Case-control	40,3:36	55 cases (33:22) 58 controls (38:20)	Mean: 15,7ng/mL(cases): 35,5ng/mL (controls)	Lower 25(OH)D levels in NF1 patients (p<0,0001) and inverse correlation with the number of neurofibromas (p<0,0003).
Brunetti-Pierri et al, 2008	USA (29° N)	Cromatografia	Descriptive	13,5 (cases)	16 cases with osteoporosis or osteopenia	Mean: 20,6ng/mL (cases)	—
Tucker et al, 2009	Germany (53° N)	Technical unreported; winter and summer	Case-control	Men 43,4 and Women 42,1 (cases)	72 cases (43:29)	<20ng/mL in 56% (cases)	Lower 25(OH)D levels in NF1 patients (p<0,001)
Seitz et al, 2010	Germany (53° N)	RIA; autumn, winter and spring	Case-control	44,36: 46,97	14 cases (9:5) 42 controls (27:15)	Range: 5-23ng/mL (cases): 13-46ng/mL (controls)	Lower 25(OH)D levels in NF1 patients (<0,05)
Stevenson et al, 2011	USA (40°N)	CLIA	Case-control	9,3 (controls)	109 cases (50:59) 218 controls	Mean: 31,76ng/mL (cases): 33,79ng/mL (controls).	Lower 25(OH)D levels in NF1 patients (0,0129)
Petramala et al, 2011	Italy (42°N)	RIA; autumn and winter	Case-control	41,1:44,3	70 cases 60 controls	Mean: 21,8ng/mL (cases): 32,9ng/mL (controls)	Lower 25(OH)D levels in NF1 patients (<0,01)

NF: Neurofibromas; 25(OH)D: 25-hydroxy-vitamin D; CLBPA: Teste Automatizado de Quimioluminescência de ligação à proteína; RIA: Radioimunoensaio; CLIA: Quimioluminescência intrassaio.

* Levels may vary according to the method used in the dosage (SNELLMAN et al, 2010; THACHER and CLARKE, 2011).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Até o momento foram publicados seis trabalhos em que foi dosado os níveis plasmáticos de 25(OH)D em pacientes com diagnóstico de NF1, que estão evidenciados no ANEXO B. Destes, cinco foram estudos caso-controle e um descritivo. Todos os estudos foram realizados no hemisfério norte, um na Itália, dois deles foram realizados no EUA e os restantes na Alemanha, inclusive o descritivo. Os métodos utilizados para a dosagem foram diferentes e a maioria foi pareada por sexo e idade. Apenas Lammert et al, 2006, encontrou correlação entre o maior número de NF e os níveis mais baixos de 25(OH)D. Stevenson et al, 2011 não encontrou associação entre os níveis de 25(OH)D e gliomas ópticos (LAMMERT et al, 2007; BRUNETTI-PIERRI et al, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010; STEVENSON et al, 2011; PETRAMALA et al, 2011).

Embora biologicamente plausível, a associação entre a presença de maior número de NF em pessoas com baixos níveis de vitamina D permanece controversa e não foi demonstrada em todos os estudos. De fato, apenas o grupo de Lammert et al, 2006, conseguiu evidenciar tal associação. Contra esta hipótese, Stevenson et al, 2011, não evidenciou associação entre níveis mais baixos de vitamina D e maior número de NF (ou gliomas ópticos) (LAMMERT et al, 2007; BRUNETTI-PIERRE et al, 2008; TUCKER et al, 2009; SEITZ et al, 2010, STEVENSON et al, 2011, PETRAMALA et al, 2011). Nossos dados não indicam que possa existir ligação menores níveis de vitamina D ou os polimorfismos às piores apresentações da doença.

Na década de 90, Nakayama et al, publicou dois trabalhos sugerindo a melhora de dois importantes sinais cardinais da NF1, NF e CLS, com o uso da vitamina D tópica (NAKAYAMA, 1997; NAKAYAMA, 1999). Adicionalmente, em 2007, Yoshida et al, publicou um artigo em que oito pacientes com diagnóstico clínico de NF1 foram tratados com luz intensa pulsada e vitamina D tópica e apresentaram melhora das manchas pigmentadas (Yoshida, 2007). Estes achados poderiam ser

explicados apenas pelo potente efeito anti-proliferativo da vitamina D através da inibição da transcrição gênica, por exemplo, através da inibição do oncogene c-FOS.

Lammert et al, 2006, sugeriu que os baixos níveis de vitamina D poderiam estar relacionados a menor exposição solar em pacientes com maior visibilidade da doença, porém, apenas um de nossos casos referiu evitar exposição solar (por outros motivos que não a NF1). Nenhum dos pacientes referiu se cobrir mais do que a população geral para esconder suas lesões de pele.

Embora nosso trabalho não tenha evidenciado maior incidência de hipovitaminose D nos casos, parece realmente haver uma maior taxa de reabsorção óssea em pessoas com NF1, que como sugerido, ocorreria pelo aumento da expressão de RANKL nos osteoblasto através do aumento da sinalização Ras-MAPK, que é um importante regulador do balanço entre a ação de osteoblastos e osteoclastos. Esta parece ser a razão para a maior incidência de osteomalácia e osteoporose neste grupo de pacientes (ELEFTERIOU et al, 2006; WADA et al, 2006; SCHINDELER & LITTLE, 2007; CHO et al, 2008).

Vários estudos mostraram que a deficiência de vitamina D é muito mais frequente do que se esperava principalmente em países nórdicos e em idosos, tanto pela pouca exposição solar como pela baixa ingestão alimentar de precursores de vitamina D (HOLICK, 2006b). Estudos realizados no Brasil que avaliaram a prevalência de hipovitaminose D em grupos específicos evidenciaram níveis adequados de 25(OH)D em Recife (8°S) e São Paulo (21°S), hipovitaminose D em 42,4% dos pacientes em Minas Gerais (19°S), porém no Rio Grande do Sul (30°S), provavelmente devido a suas condições climáticas e ao perfil de risco dos pacientes (internados em enfermarias e médicos residentes), se observa uma alta prevalência de hipovitaminose D (PREMAOR et al, 2004; PREMAOR & FURLANETTO, 2006; SILVA et al, 2008, PREMAOR et al, 2008). Em um estudo transversal com médicos residentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a média dos níveis séricos de 25(OH)D foram 17.9+/-8.0 ng/mL e 57.4% apresentaram níveis abaixo de 20ng/mL. (PREMAOR et al, 2008). Há de se pensar que a hipovitaminose D seja um problema

de saúde pública no Rio Grande do Sul independentemente da NF1, pois aproximadamente 78% dos sujeitos da pesquisa apresentaram deficiência ou insuficiência de vitamina D. Também por causas dessa grande prevalência não foi possível realizar correlações entre alguns dos parâmetros quantitativos, principalmente aqueles pouco prevalentes em pessoas com NF1. Outro fato que prejudicou a correlação entre o fenótipo e os níveis de vitamina D foi o fato de nossos pacientes embora mais heterogêneos em seu fenótipo que os apresentados por Lammert et al, 2006, compartilhasse o mesmo grupo de categorização com muita frequência. Os polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene *VDR* não estão correlacionadas com menos níveis de 25(OH)D em nossos casos.

Chamou-nos atenção o fato de que, em análises individuais, os piores níveis de vitamina D estavam entre os casos, visto que entre os controles o menor nível de vitamina D foi 14,1ng/mL e entre os casos foi 5,27ng/mL. No entanto, encontramos apenas cinco pessoas entre casos com valores menores do que 15ng/mL e três pessoas entre os controles. Ademais, tanto na análise do conjunto de todas as mensurações de vitamina D (representada por histogramas), quanto nas médias dos níveis de vitamina D entre os grupos, deficiência e insuficiência de vitamina D (com pontos de corte definidos em 20 e 30 ng por mL, respectivamente) ocorreram mais frequentemente entre os controles do que nos casos. Sendo assim, é possível que deficiência de vitamina D possa estar associada a situações específicas da NF1, ou a casos particularmente graves, mas que não foram identificados em nosso estudo pelo limitado tamanho amostral e amostra relativamente homogênea de pacientes, em termos de gravidade fenotípica (ANEXO M). O tamanho amostral pode ser uma questão ainda mais importante no estudo dos níveis de vitamina D em regiões onde existe alta prevalência de hipovitaminose D na população geral.

Outra questão importante é o período de coleta para análise dos níveis de vitamina D. Embora Lammert et al, 2006, tenham encontrado níveis comparáveis de 25(OH)D nos pacientes dosados no inverno e no verão, devido a alta prevalência de hipovitaminose D em nossa amostra, talvez uma coleta ao final do verão (para excluir falta de exposição solar) pudesse estar associada a resultados diferentes.

Ao final do presente estudo concluímos que a hipovitaminose D é prevalente entre os pacientes com NF1 e indivíduos não afetados atendidos nos ambulatórios de genética clínica do HCPA. Estes achados devem servir de alerta para profissionais de saúde que acompanham pacientes com a doença. Esperamos que este estudo sirva de estímulo à continuidade de outras investigações nessa linha de pesquisa. Ainda não estão claramente definidas as causas da deficiência ou insuficiência de vitamina D em pacientes com NF1 e controles. Da mesma forma, consideramos ainda controversa a associação de hipovitaminose D com a expressão fenotípica na NF1. Estudos adicionais, em diferentes regiões geográficas são necessários para melhor definir estas questões.

ANEXOS

ANEXO A: Escala de Riccardi

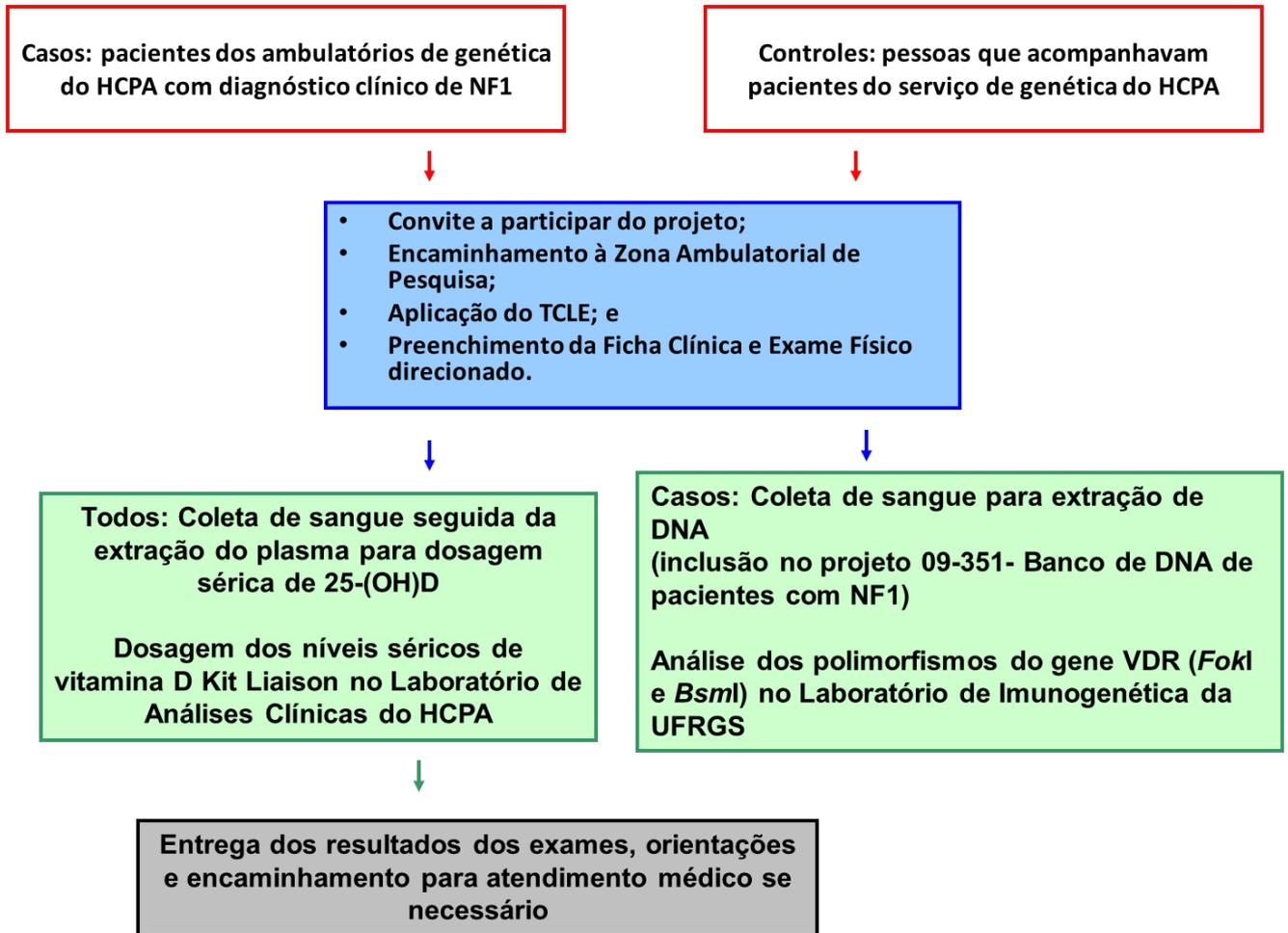
Características	Graus de gravidade			
	1	2	3	4
Anatômicos/estruturais				
Pigmentação				
CLS	+	+	+	0
Efélides	+	+	0	0
Neurofibromas				
Pele				
Cutâneos	+	+	+	+
Subcutâneos	+	+	+	+
Profundos				
Discretos	E	+	+	+
Difusos				
Craniofacial	E	E	+	+
Paraespinal	E	E	+	+
Membros	E	E	+	+
Visceral	E	+	+	+
Tumores de SNC				
Orbitário	E	E	+	+
Intracraniano	E	E	+	+
Espinhal	E	E	+	+
Ocular				
Nódulos de Lisch	+	0	0	0
Nervos corneanos	+	0	0	0
Hamartomas de coroide	+	0	0	0
Glaucoma, etc	E	+	+	+
Esqueléticos				
Baixa estatura	E	+	+	0
Macrocefalia	+	0	0	0
Displasia craniofacial	E	+	+	+
Espinhal				
Displasia vertebral	E	+	+	+
Escoliose	E	+	+	+
Curvaturas da coluna lombar	+	0	0	0
Pseudoartrose				
Tibial	E	E	+	+
Radial	E	E	+	+
<i>Genu valgum/varum</i>	E	+	+	0
<i>Pectus excavatum</i>	+	+	+	0
Outros	E	+	+	+
Outros tumores				
Feocromocitoma	E	E	+	+
Outros tumores	E	+	+	+
Ganglioneuromatose de cólon	E	+	+	0
Malignidades	E	E	E	+

(continua)

Características	Graus de gravidade			
	1	2	3	4
Vascular				
Angiomas	E	+	+	+
Renal	E	E	+	+
Cerebral	E	E	+	+
Outras vasculares	E	+	+	+
Ventrículos cerebrais				
Dilatação	E	E	+	0
Hidrocefalia	E	E	+	+
Cáries dentárias excessivas	E	+	+	0
Alterações EEG	E	+	+	0
Outros anatômicos/estruturais	E	+	+	+
Funcionais				
Pessoa como um todo/morte	E	E	+	+
Cosmética	E	+	+	+
Dano hipertrófico	E	E	+	+
Neurológicos				
Fraqueza/paralisia	E	E	+	+
Incoordenação	E	+	+	+
Dor	E	+	+	+
Convulsões	E	E	+	+
Outros neurológicos	E	+	+	+
Estrabismo	E	+	+	0
Dano visual	E	E	+	+
Dano auditivo	E	+	+	+
Dano a fala	E	+	+	0
Intelectual				
Atraso de desenvolvimento	E	+	+	+
Dificuldade de aprendizado	E	+	+	+
Problemas na performance escolar	E	+	+	+
Deficiência mental	E	E	E	+
Psicológicos				
Carga psicossocial	E	+	+	+
Distúrbios psiquiátricos	E	E	+	+
Cefaléia	E	+	+	0
Distúrbios da puberdade	E	E	+	+
Prurido	E	+	+	+
Constipação	E	+	+	0
Hemorragia de trato gastrointestinal	E	E	+	+
Hipertensão	E	E	+	+
Agravamento com a gestação	E	+	+	+
Cirurgia	E	+	+	+
Outros funcionais	E	+	+	+

Notas: +, a característica é consistente com o grau de gravidade designado; se mais de um grau de gravidade é designado, existem graus de gravidade para este achado; se apenas um grau de gravidade é designado, então o achado é meramente útil para o diagnóstico (grau 10 ou isto é exigido para o maior grau de gravidade (4)). E, a característica exclui o grau de gravidade em questão. 0, a característica não é um critério para designar o grau de gravidade.

ANEXO B – Logística do estudo



Os voluntários do projeto de pesquisa 09-479 foram encaminhados para consulta na Zona Ambulatorial de Pesquisa do HCPA onde aplicamos o(s) Termo(s) de Consentimento(s) Livre(s) e Esclarecido(s) (Anexos D, E e F) conforme fossem pessoas com e sem o diagnóstico de NF1, preenchemos a Ficha Clínica (ANEXO G) com dados fornecidos pelo paciente e encontrados nos prontuários eletrônicos e de papel e coletamos sangue para dosagem da 25-hidroxi-vitamina D plasmática (25-(OH)D) (ANEXO H) e para extração de DNA. Durante a entrega dos resultados dos exames, caso necessário, oferecemos uma Folha Informativa (ANEXO I) assim como o laudo aprovado pelo Laboratório de Patologia Clínica conforme o resultado, normal, insuficiente e deficiente (ANEXOS J, K e L, respectivamente).

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para dosagem de 25(OH)D de pessoas com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA DOSAGEM DE VITAMINA D

“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D EM PACIENTES ADULTOS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE NEUROFIBROMATOSE TIPO1 COMPARADOS AOS CONTROLES E AOS ACHADOS CLÍNICOS PRINCIPAIS DA DOENÇA”

Larissa Souza Maria Bueno, Patrícia Izetti Ribeiro, Cristina Brickmann Oliveira Netto, Patricia Ashton-Prolla.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) está realizando um estudo para avaliar a dosagem sérica (no sangue) dos níveis de vitamina D em pacientes com Neurofibromatose tipo 1 comparado a pessoas sem Neurofibromatose tipo 1. Iremos também comparar os níveis séricos de vitamina D dos pacientes com os achados da doença.

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo pois apresenta diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1. O estudo envolve participar de uma consulta para preenchimento de uma ficha clínica pelo médico e coleta de sangue para realização da dosagem sérica de vitamina D.

Os riscos envolvidos em participar do projeto envolvem os riscos de uma punção venosa (coleta de sangue), que são equimose, hematoma e dor no local da punção. As complicações são principalmente agudas, dessa forma, estaremos junto com você na hora da coleta para tomar as medidas caso sejam necessárias e caso ocorram complicações tardias vocês deverão procurar pronto atendimento e/ou entrar em contato conosco.

Os benefícios são que o resultado deste estudo será importante para que possamos entender melhor se há níveis séricos mais baixos de vitamina D nos pacientes com Neurofibromatose tipo 1 e se há relação entre a dosagem sérica da vitamina D e os achados da Neurofibromatose tipo 1 e que caso os níveis de vitamina D se encontrem alterados e seja necessário tratamento iremos entrar em contato com você caso você deseje saber o resultado para tratamento. O tratamento, caso necessário e desejado, será realizado via Sistema Único de Saúde.

- Quero saber se meus níveis de vitamina D estiverem alterados e necessitar de tratamento:

() sim () não

Obs.: O contato será feito por telefone ou carta. Mantenha o seu telefone e endereço atualizado conosco.

- Para pacientes com prontuário no HCPA: autoriza a liberação de seus resultados de análise laboratorial no prontuário eletrônico da Instituição: () sim () não

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.

Você pode escolher se quer ou não participar do estudo. Se você decidir que não quer participar, isso não afetará de maneira alguma o seu atendimento e tratamento nesta instituição. Se você aceitar participar, será preenchida uma ficha de clínica com seus dados pessoais e informações clínicas e coletado sangue para a realização do exame. Além disso, estaremos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir durante a sua participação no estudo.

Eu _____ concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Nome e assinatura do paciente

Telefone para contato: _____

Nome e assinatura do entrevistador

Data: ____/____/____

Pesquisadores responsáveis: Dra. Patricia Ashton Prolla e Larissa Souza Mario Bueno

Telefones para contato: (51) 3359-7661 e (51) 3359-8011

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para dosagem de 25(OH)D de pessoas sem diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA DOSAGEM DE VITAMINA D

“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D EM PACIENTES ADULTOS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE NEUROFIBROMATOSE TIPO1 COMPARADOS AOS CONTROLES E AOS ACHADOS CLÍNICOS PRINCIPAIS DA DOENÇA”

Larissa Souza Maria Bueno, Patrícia Izetti Ribeiro, Cristina Brickmann Oliveira Netto, Patricia Ashton-Prolla.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) está realizando um estudo para avaliar a dosagem sérica (no sangue) dos níveis de vitamina D em pacientes com Neurofibromatose tipo 1 comparado a pessoas sem Neurofibromatose tipo 1. Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo no grupo dos pacientes sem diagnóstico de Neurofibromatose tipo 1, o que envolve uma consulta para preenchimento de uma ficha clínica pelo médico e coleta de sangue para realização da dosagem sérica de vitamina D.

Os riscos envolvidos em participar do projeto envolvem os riscos de uma punção venosa (coleta de sangue), que são equimose, hematoma e dor no local da punção. As complicações são principalmente agudas, dessa forma, estaremos junto com você na hora da coleta para tomar as medidas caso sejam necessárias e caso ocorram complicações tardias vocês deverão procurar pronto atendimento e/ou entrar em contato conosco.

Os benefícios são que o resultado deste estudo será importante para que possamos entender melhor se há níveis séricos mais baixos de vitamina D nos pacientes com Neurofibromatose tipo 1 e se há relação entre a dosagem sérica da vitamina D e os achados da Neurofibromatose tipo 1 e que caso os níveis de vitamina D se encontrem alterados e seja necessário tratamento iremos entrar em contato com você caso você deseje saber o resultado para tratamento. O tratamento, caso necessário e desejado, será realizado via Sistema Único de Saúde.

Você pode escolher se quer ou não participar do estudo. Se você decidir que não quer participar, isso não afetará de maneira alguma o seu atendimento e tratamento nesta instituição. Se você aceitar participar, será preenchida uma ficha de clínica com seus dados pessoais e informações clínicas e coletado sangue para a realização do exame. Além disso,

estaremos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir durante a sua participação no estudo.

O resultado deste estudo será importante para que possamos entender melhor se há níveis séricos mais baixos de vitamina D nos pacientes com Neurofibromatose tipo 1 e se há relação entre a dosagem sérica da vitamina D e os achados da neurofibromatose tipo 1. Caso os níveis de vitamina D se encontrem alterados e seja necessário tratamento iremos entrar em contato com você caso você deseje.

- Quero saber se meus níveis de vitamina D estiverem alterados e necessitar de tratamento:

() sim () não

Obs.: O contato será feito por telefone ou carta. Mantenha o seu telefone e endereço atualizado conosco.

- Para pacientes com prontuário no HCPA: autoriza a liberação de seus resultados de análise laboratorial no prontuário eletrônico da Instituição: () sim () não

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.

Eu _____ concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Nome e assinatura do paciente

Telefone para contato: _____

Nome e assinatura do entrevistador

Data: ____/____/____

Pesquisadores responsáveis: Dra. Patricia Ashton Prolla e Larissa Souza Mario Bueno

Telefones para contato: (51) 3359-7661 e (51) 3359-8011

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue e extração de DNA de pessoas com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Termo de Consentimento Informado

Projeto de Pesquisa: “Caracterização Clínica de uma Amostra de Pacientes com Neurofibromatose Tipo 1 em um Centro de Referência”

Pesquisadores responsáveis: Médica Denise Isabel Zandoná
Dra. Patrícia Ashton-Prolla
Dr. Roberto Giugliani
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350 – Tel. 2101-8011

Tempo de duração: 24 meses

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa que vai avaliar as características de pessoas com Neurofibromatose Tipo 1 no Rio Grande do Sul. Este projeto tem como objetivo reunir informações relativas a neurofibromatose em pessoas de diferentes idades, sexos e origens. Desta maneira, espera-se aumentar o entendimento da doença. Todo paciente com diagnóstico clínico confirmado de neurofibromatose tipo 1 pode participar desta pesquisa, independente da gravidade das manifestações clínicas e tipo de tratamento que recebeu ou está recebendo.

Como parte da pesquisa serão obtidas informações sobre as avaliações e exames realizados como parte do seu acompanhamento médico passado e atual. Estas informações serão obtidas mediante a revisão de prontuário/fichas clínica, entrevistas pessoais com você e/ou seu médico(a). Além disso, ao participar deste estudo você está concordando em doar uma amostra de sangue de (20mL) que será armazenada para uso posterior em estudos das alterações genéticas (de DNA). Esta amostra será utilizada futuramente para estudar as alterações genéticas que causam e/ou modificam o curso natural da Neurofibromatose tipo 1 em pessoas do nosso meio. O DNA será armazenado no HCPA de forma segura e poderá ser usado somente para fins de pesquisa em neurofibromatose tipo 1.

Apenas os pesquisadores vinculados a este projeto e o comitê de ética em pesquisa do HCPA, em caso de auditoria, poderão ter acesso aos registros constantes nesse banco de dados e nos prontuários dos pacientes.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS DA PESQUISA:

Os riscos associados à coleta de sangue embora mínimos; incluem a possibilidade de ocorrerem manchas roxas (hematomas) e dor no local da coleta. O desconforto e riscos serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DA PESQUISA:

Pode não haver nenhum benefício direto pra você, mas os resultados desse projeto podem fornecer informações valiosas sobre a neurofibromatose e seu tratamento.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
19/12/05
r 05354

© P. P. G. - Recebido

12 SET 2005

05-357

DÚVIDAS:

Se você tiver alguma dúvida em relação a pesquisa, deve contatar um dos investigadores da pesquisa no Serviço de Genética Médica/HCPA, rua Ramiro Barcellos, 2350-Porto Alegre-RS, Tel.: 51 2101-8309/51 21018011

AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para não revelar sua identidade. A comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os pesquisadores responsáveis podem pesquisar seus registros médicos relacionados à pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO:

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode recusar-se a participar ou a prosseguir no estudo, sem que isso afete sua assistência médica atual ou futura. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo(a) e/ou pelos pesquisadores. Em qualquer caso, você não será penalizado.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

19 / 12 / 05
805303

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado(a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

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 a 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, para utilização futura.

SIM

NÃO

6. Autorizo a utilização de minha amostra de DNA caso surjam novos estudos sobre neurofibromatose no futuro.

SIM

NÃO

7. 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

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

SIM

NÃO

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

**HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA**

13 / 12 / 05
R 05353

10. Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do entrevistador Nome por extenso Local e Data

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

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

15 / 12 / 05
E 05354

ANEXO G – Curva de calibração e resultados da dosagem de 25(OH)D

Calibração : 25OHD

Liaison - 2229000952

ID da curva principal: 614500
 Número do lote: 123839
 Número do kit: 11177
 Data de execução: 17.05.2010, 09:23:36
 Data de execução: 17.05.2010, 08:14:50
 Estado da calibração: Terminado, Calculado

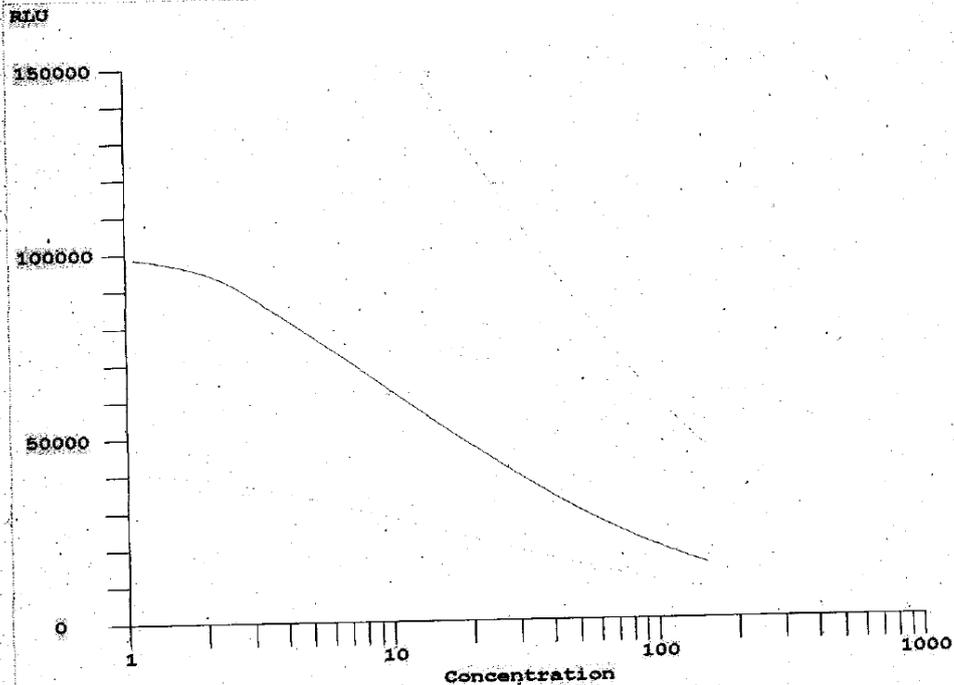
	Calibrador 1	Calibrador 2
1 :	84709	23169
2 :	81058	23496
3 :	80135	23493
Média:	81967	23386
CV:	2.95	0.80
Desvio [%]:	-17.54	-32.69
	(-65..+99%)	(-65..+99%)

	ng/mL	
Concentração :	4.000	75.000
Concentração esperada:	3.999	74.998
Concentração calculada:	-0.02	-0.00
Desvio [%]:	(-30..+30%)	(-30..+30%)

Controlo geométrico da curva:

A :	RLU 81960 ->	4.000 ng/mL
B :	RLU 23385 ->	75.000 ng/mL
Proporção:	0.285	(0.270..0.390)

Intervalo do sinal [RLU]:
 MSR (baixo):
 WSR (baixo):
 MSR (alto):
 WSR (alto):



Anexo:
 Resultados:

ID da amostra	Teste	Dil.	RLU		Concentração	Avis.
25OHVITD 1	951125	25OHD	10.7	- 19.9	14.4 ng/mL	
25OHVITD 2	951126	25OHD	38.5	- 62.7	52.6 ng/mL	
25OHVITD 2	951126	25OHD	38.5	- 62.7	50.4 ng/mL	
25OHVITD 2	951126	25OHD	38.5	- 62.7	51.5 ng/mL	cv: 3.0%
1	25OHD		32638		42.0 ng/mL	
2	25OHD		76167		5.27 ng/mL	
3	25OHD		40702		27.3 ng/mL	
4	25OHD		45698		21.4 ng/mL	
5	25OHD		49448		17.9 ng/mL	
6	25OHD		39125		29.6 ng/mL	
7	25OHD		45441		21.7 ng/mL	
8	25OHD		34425		38.1 ng/mL	
9	25OHD		45754		21.3 ng/mL	
10	25OHD		44196		23.0 ng/mL	
11	25OHD		44269		22.9 ng/mL	
12	25OHD		55502		13.5 ng/mL	
13	25OHD		36519		34.0 ng/mL	
14	25OHD		38710		30.3 ng/mL	
15	25OHD		44305		22.9 ng/mL	
16	25OHD		38074		31.3 ng/mL	
17	25OHD		38106		31.2 ng/mL	
18	25OHD		43730		23.5 ng/mL	
19	25OHD		52717		15.4 ng/mL	
20	25OHD		40130		28.1 ng/mL	
21	25OHD		37745		31.8 ng/mL	
22	25OHD		33962		39.0 ng/mL	
23	25OHD		46295		20.8 ng/mL	
24	25OHD		50828		16.8 ng/mL	
25	25OHD		34791		37.3 ng/mL	
26	25OHD		56668		12.8 ng/mL	
27	25OHD		49463		17.9 ng/mL	
28	25OHD		32961		41.3 ng/mL	
29	25OHD		37302		32.6 ng/mL	
30	25OHD		43787		23.5 ng/mL	
31	25OHD		43111		24.2 ng/mL	
32	25OHD		46886		20.2 ng/mL	

ID da amostra	Teste	Dil.	RLU	Concentração	Avis.
33	25OHD		42414	25.1 ng/mL	
34	25OHD		54100	14.4 ng/mL	
35	25OHD		65901	8.45 ng/mL	
36	25OHD		39721	28.7 ng/mL	
37	25OHD		35813	35.3 ng/mL	
38	25OHD		41550	26.2 ng/mL	
39	25OHD		39543	29.0 ng/mL	
40	25OHD		47285	19.8 ng/mL	
41	25OHD		40975	27.0 ng/mL	
42	25OHD		52436	15.6 ng/mL	
43	25OHD		39023	29.8 ng/mL	
44	25OHD		42308	25.2 ng/mL	
45	25OHD		38497	30.6 ng/mL	
46	25OHD		37661	32.0 ng/mL	
47	25OHD		41259	26.6 ng/mL	
48	25OHD		31707	44.3 ng/mL	
49	25OHD		37391	32.4 ng/mL	
50	25OHD		42100	25.5 ng/mL	
51	25OHD		43699	23.6 ng/mL	
52	25OHD		44802	22.3 ng/mL	
53	25OHD		48579	18.6 ng/mL	
54	25OHD		37664	32.0 ng/mL	
55	25OHD		43466	23.8 ng/mL	
56	25OHD		48023	19.1 ng/mL	
57	25OHD		39337	29.3 ng/mL	
58	25OHD		49907	17.5 ng/mL	
59	25OHD		46382	20.7 ng/mL	
60	25OHD		47424	19.7 ng/mL	
61	25OHD		36185	34.6 ng/mL	
62	25OHD		47907	19.2 ng/mL	
63	25OHD		48675	18.6 ng/mL	
64	25OHD		41829	25.8 ng/mL	
65	25OHD		42984	24.4 ng/mL	
66	25OHD		40768	27.2 ng/mL	

ID da amostra	Teste Dil.	RLU	Concentração	Avis
67	25OHD	37358	32.5 ng/mL	
68	25OHD	45595	21.5 ng/mL	
69	25OHD	43060	24.3 ng/mL	
70	25OHD	46160	20.9 ng/mL	
71	25OHD	46605	20.5 ng/mL	
72	25OHD	54487	14.2 ng/mL	
73	25OHD	45970	21.1 ng/mL	
74	25OHD	52360	15.6 ng/mL	
75	25OHD	47231	19.9 ng/mL	
77	25OHD	43049	24.3 ng/mL	
78	25OHD	41762	25.9 ng/mL	
79	25OHD	50101	17.4 ng/mL	
80	25OHD	44919	22.2 ng/mL	
81	25OHD	43033	24.3 ng/mL	
82	25OHD	53152	15.1 ng/mL	
83	25OHD	44843	22.3 ng/mL	
84	25OHD	54531	14.2 ng/mL	
85	25OHD	52136	15.8 ng/mL	
86	25OHD	48482	18.7 ng/mL	
87	25OHD	54674	14.1 ng/mL	
88	25OHD	42986	24.4 ng/mL	
89	25OHD	36520	34.0 ng/mL	
90	25OHD	47314	19.8 ng/mL	
91	25OHD	52812	15.3 ng/mL	
92	25OHD	45249	21.9 ng/mL	

ANEXO H-I – Folha Informativa**Folha Informativa projeto: 09-479**

“Avaliação dos níveis de vitamina D em pacientes adultos com diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo I comparados a controles e aos achados clínicos da doença”

Informações aos participantes com hipovitaminose D (deficiência e insuficiência de vitamina D):

Na maioria das vezes a hipovitaminose D é causada por pouca exposição à luz ultravioleta B (UVB), ou seja, pouca exposição à luz solar. Devido aos efeitos nocivos da exposição à luz solar, aumento da exposição solar não é o tratamento preconizado para os casos de hipovitaminose D.

A alimentação também é uma fonte de vitamina D, porém, o aumento da ingestão de alimentos ricos em vitamina D não é capaz normalizar os níveis séricos dessa vitamina.

Sabe-se que a hipovitaminose D pode causar osteoporose, fraqueza muscular e aumentar o risco de quedas.

Dessa forma, para as pessoas com hipovitaminose D, está recomendado o uso de vitamina D na dose de 1000 - 2000 UI por dia. Você deve procurar seu médico para verificar quais medidas devem ser tomadas.

Nesta dose o uso da vitamina D é bastante seguro e não causa intoxicação. Entretanto, se apresentar qualquer um dos seguintes sintomas você deverá procurar atendimento médico: inapetência e náusea e/ou vômito, sede excessiva, aumento da micção, fraqueza, nervosismo ou hipertensão arterial.

Dúvidas favor entrar em contato com Dra Cristina Brinckmann Netto pelo telefone (51) 33598011

Dra. Larissa Souza Mario Bueno
CRM: 33159

Dra. Patrícia Ashton Prolla
CRM: 19230

ANEXO I – Modelo de laudo para resultado de exame normal**Resultado do Projeto de Pesquisa número 09-479:**

“Avaliação dos níveis de vitamina D em pacientes adultos com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1 comparados aos controles e aos achados clínicos principais da doença”

Nome do paciente:

Este resultado de exame laboratorial é referente à investigação realizada em projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Exame realizado: Dosagem de 25-hidroxi-vitamina D por quimioluminescência pelo kit da LIAISON.

Material: plasma.

Data da coleta: / /2009.

Data da análise: 17/05/2010.

Resultado: ng/ml.

Obs.: exame de pesquisa realizado no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

Conclusão:

Resultado compatível com níveis de 25-hidroxi-vitamina D dentro da faixa de normalidade (acima de 30ng/ml).

Porto Alegre: / / 2010.

Dra. Larissa Souza Mario Bueno
CRM: 33159

Dra. Patrícia Ashton Prolla
CRM: 19230

ANEXO J – Modelo de laudo para resultado de exame com insuficiência de vitamina D

Resultado do Projeto de Pesquisa número 09-479:

“Avaliação dos níveis de vitamina D em pacientes adultos com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1 comparados aos controles e aos achados clínicos principais da doença”

Nome do paciente:

Este resultado de exame laboratorial é referente à investigação realizada em projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Exame realizado: Dosagem de 25-hidroxi-vitamina D por quimioluminescência pelo kit da LIAISON.

Material: plasma.

Data da coleta: / /2009.

Data da análise: 17/05/2010.

Resultado: ng/ml.

Obs.: exame de pesquisa realizado no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

Conclusão:

Resultado compatível com insuficiência de 25-hidroxi-vitamina D (20 – 30ng/ml). Serão fornecidas orientações sobre o encaminhamento a partir deste resultado.

Porto Alegre: / / 2010.

Dra. Larissa Souza Mario Bueno
CRM: 33159

Dra. Patrícia Ashton Prolla
CRM: 19230

ANEXO K – Modelo de laudo para resultado de exame com deficiência de vitamina D

Resultado do Projeto de Pesquisa número 09-479:

“Avaliação dos níveis de vitamina D em pacientes adultos com diagnóstico clínico de Neurofibromatose tipo 1 comparados aos controles e aos achados clínicos principais da doença”

Nome do paciente:

Este resultado de exame laboratorial é referente à investigação realizada em projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Exame realizado: Dosagem de 25-hidroxi-vitamina D por quimioluminescência pelo kit da LIAISON.

Material: plasma.

Data da coleta: / /2009.

Data da análise: 17/05/2010.

Resultado: ng/ml.

Obs.: exame de pesquisa realizado no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

Conclusão:

Resultado compatível com deficiência de 25-hidroxi-vitamina D (menor ou igual a 20ng/ml). Serão fornecidas orientações sobre o encaminhamento a partir deste resultado.

Porto Alegre: / / 2010.

Dra. Larissa Souza Mario Bueno
CRM: 33159

Dra. Patrícia Ashton Prolla
CRM: 19230

ANEXO L – Perfil clínico dos pacientes com Neurofibromatose tipo 1 que participaram deste estudo

Critérios diagnósticos de Neurofibromatose 1¹ presentes	Presença das alterações/avaliados	%
Manchas café-com-leite	33/45	73,3
Neurofibromas cutâneos	37/45	82,2
Neurofibromas plexiformes ²	17/45	37,8
Efélides axilares ou inguinais	43/45	95,5
Glioma de via óptica	1/45	2,2
Nódulos de Lisch	20/23 ³	87,0
Displasia da asa do esfenóide	2/30 ⁴	6,7
Afilamento da região cortical de osso longo com ou sem pseudoartrose	1/45	2,2
Familiar de primeiro grau afetado	33/44 ⁵	75,0

¹National Institute of Health Consensus development Conference Statement: Neurofibromatosis. Bethesda, 1988.

²Somente os casos confirmados com biópsia.

³22 pacientes não compareceram à consulta com o oftalmologista por razões pessoais.

⁴15 pacientes não compareceram para a realização do RX por razões pessoais, porém nenhuma delas apresentava evidências de displasia de osso esfenóide.

⁵ uma pessoa foi adotada e desconhece.