

Análise histológica dos componentes fibrosos dos neurofibromas na neurofibromatose tipo 1 (NF1)

Histological analysis of fibrous components of the neurofibromas in neurofibromatosis type 1 (NF1)

Ana Luiza Magnabosco¹; Carlos Eduardo de Mathias Sanches¹; Sebastião Roberto Taboga²; Eny Maria Goloni-Bertollo³; Júlio César André⁴

¹Acadêmicos do 6º ano de Medicina*; ²Professor Adjunto do Departamento de Biologia**; ³Professora Adjunta do Departamento de Biologia Molecular e Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM*; ⁴Professor Adjunto do Departamento de Anatomia*

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

** Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - IBILCE –UNESP

Resumo Neurofibromas múltiplos representam o mais importante componente clínico da neurofibromatose tipo 1 (NF1). Uma das mais comuns doenças Mendelianas, inclui a maioria de todos os princípios essenciais da genética humana, caracterizando um padrão autossômico dominante. O neurofibroma é um complexo tumor benigno da bainha dos nervos periféricos que possui um aspecto histológico típico. Foram analisadas biópsias de 31 neurofibromas de pacientes acometidos de NF1, à procura de variações nos componentes fibrilares do estroma da lesão. Nestes as fibras elásticas estão presentes em quantidade comparável ao que pode ser visto na pele, porém mais delgadas e com distribuição menos compacta, as fibras colágenas do tipo III (reticulares) estão presentes em quantidades menores do que na pele suprajacente, sendo que esta diminuição é estatisticamente significativa e as fibras colágenas do tipo I estão presentes em quantidades menores do que na pele suprajacente, sendo que esta diminuição é estatisticamente significativa e as mesmas são o componente fibrilar predominante dos neurofibromas.

Palavras-chave NF1, neurofibromas, fibras, histocitoquímica, matriz extracelular.

Abstract Multiple neurofibromas represent the most important clinical component of neurofibromatosis type 1 (NF1). One of the most common Mendelian diseases, including most of all the essential principles of human genetics, featuring an autosomal dominant pattern. Neurofibroma is a benign tumor of complex peripheral nerve sheath that has a typical histologic appearance. The research analyzed biopsies from 31 neurofibromas from patients afflicted with NF1, looking for variations in the fibrous components in the stroma of the lesion. In this the elastic fibers are present in an amount comparable to what can be seen in the skin, but more slender and less compact distribution, collagen fibers of type III (reticular) are present in smaller amounts than in the overlying skin, and this decrease is statistically significant and the type I collagen fibers are present in smaller amounts than in the overlying skin, and this decrease is statistically significant and they are the predominant fibrillar component of neurofibromas.

Keywords NF1, neurofibromas, fibers, histochemistry, extracellular matrix.

Introdução

A neurofibromatose (NF) é um grupo heterogêneo de condições que exibe manifestações clínicas resultantes de anormalidades neuroectodérmicas¹, comprometendo, principalmente, a pele, os olhos, os ossos, o sistema nervoso e, eventualmente, outros órgãos internos². Estas manifestações podem ser vistas nas duas formas clássicas de NF, a neurofibromatose do tipo 1 (NF1) e a neurofibromatose do tipo 2 (NF2)³.

A neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma afecção autossômica dominante que afeta aproximadamente 1 em cada 3.000-4.000 indivíduos no mundo, uma das mais comuns doenças mendelianas⁴. Atinge ambos os sexos e todas as raças igualmente^{5,6}.

Ela foi inicialmente introduzida à comunidade médica em 1882 pelo Dr. Von Recklinghausen, que demonstrou que os tumores nesta condição originam-se do nervo. A partir daí consagrou-

se o uso do termo neurofibroma para o tumor e neurofibromatose para a condição de múltiplos neurofibromas.

A NF1 é uma doença progressiva, associada com uma variedade de manifestações clínicas, em que a expectativa de vida e a capacidade reprodutiva dos pacientes são menores que o normal. As causas mais comuns de morte – câncer, infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e pneumonia – são similares aquelas da população geral, mas, frequentemente, ocorrem mais cedo⁴.

O neurofibroma é um complexo tumor benigno da bainha dos nervos periféricos que possui um aspecto histológico típico. Embora não patognomônicos, aparecem em 100% dos pacientes com NF1⁷, eles surgem na infância ou adolescência, depois das manchas café-com-leite. Há grande variabilidade, alguns surgem ao nascimento, e outros aparecem na fase adulta, sendo que o seu número e volume tendem a aumentar durante a vida⁸.

Macroscopicamente, a aparência do neurofibroma varia de uma lesão para outra, assumindo várias formas⁹. Os aspectos microscópicos das formas de neurofibromas diferem em graus variados. A estrutura básica é de células fusiformes, com núcleo pequeno, alongado e normocromático, dispersas e embebidas numa matriz rica em mucopolissacarídeos¹ e fibras colágenas dos tipos I, III, IV, V, VI. Compreendem múltiplos tipos celulares como os neurolemócitos (células de Schwann), células perineurais, fibroblastos, células endoteliais, pericitos, mastócitos, axônios e ocasionalmente células pigmentadas.

Os estudos ultraestruturais dos neurofibromas são poucos e frequentemente com resultados conflitantes⁹⁻¹².

A imunohistoquímica também tem sido usada para caracterizar os componentes celulares dos tumores^{10,12,13}, bem como análises bioquímicas e hibridização *in situ*⁹.

Apesar da variabilidade do aspecto microscópico das cinco formas de neurofibromas, Riccardi (2007)¹⁴ afirma que as características histológicas dos neurofibromas são monotonamente consistentes de um paciente para outro, de um local para outro no mesmo paciente e da época de aparecimento ou de um lugar para outro em um mesmo tumor.

O objetivo da pesquisa foi evidenciar a existência ou não de variações nos componentes fibrosos do estroma da lesão numa amostra de 31 neurofibromas de pacientes acometidos de NF1, comparando-os com a pele suprajacente ao tumor, por meio da análise histológica, com técnicas citoquímicas e histoquímicas, das lesões.

Metodologia

Foram analisadas 31 lesões cutâneas de pacientes acometidos de NF1, de diferentes famílias, cadastradas pelo CEPAN (Centro de Pesquisa e Atendimento em Neurofibromatose) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Autarquia Estadual/FAMERP, oriundas da amostragem coletada para o projeto devidamente aprovado pelo CEP – FAMERP (Parecer 041/99). A coleta do material foi feita no Serviço de Dermatologia da FUNFARME-FAMERP, por meio de biópsia, após assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido. A biópsia foi realizada por profissional competente e o material coletado foi processado para análise histológica em microscopia de luz, no

Laboratório de Histotecnologia da FAMERP.

Foram biopsiados neurofibromas cutâneos e neurofibromas plexiformes. O material obtido por biópsia foi fixado em formalina neutra tamponada a 10% e incluído em parafina. Cortes histológicos de obtidos do material incluído e montados em lâminas silanizadas.

Aos cortes desparafinizados aplicaram-se técnicas citoquímicas e histoquímicas (colorações especiais) com o objetivo de evidenciar a eventual presença dos componentes extracelulares dos neurofibromas, tal como pode ser visto no quadro que se segue:

TÉCNICA DE COLORAÇÃO	COMPONENTE IDENTIFICADO
Hematoxilina-Eosina ¹⁵	Organização Geral e Fibras Elásticas
Resorcina-Fucsina com Oxidação Prévia ¹⁶	Fibras Elaunínicas e Oxitalânicas
Impregnação Argêntica ¹⁵	Fibras Colágenas do Tipo III
Tíncromo da Picrosirius-Hematoxilina ¹⁷	Fibras Colágenas do Tipo I e III

Para a avaliação da frequência relativa dos componentes teciduais dos neurofibromas, os cortes histológicos foram submetidos ao sistema-teste de arranjo triangular M168, segundo Weibelet al. (1978)¹⁸, com 130 pontos no sistema¹⁹. Para esta análise, 50 campos de lâminas coradas pelas técnicas específicas acima listadas (Tabela 1), de cada neurofibroma, foram aleatoriamente selecionados. A frequência relativa foi calculada de acordo com os pontos do sistema-teste que tocarem os componentes analisados, ou seja, células e estroma e cada componente do estroma. A partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi realizado o cálculo percentual da frequência relativa dos componentes em questão.

A análise estatística de todos os dados coletados foi realizada em planilhas e gráficos do software Statistica 5.0 (Copyright©StaSoft,). O teste de hipótese utilizado para a averiguação da significação foi o de Anova, sendo o nível de significância adotado de 5% (p < 0,05).

Resultados

O método da resorcina-fucsina com oxidação prévia aplicado aos neurofibromas mostrou a existência de fibras elásticas na pele suprajacente (Figura 1A) e nos neurofibromas (Figura 1B), com uma frequência relativa sem diferenças estatisticamente significativas para a pele e o neurofibroma (Tabela 1).

A avaliação das mesmas na coloração com hematoxilina-eosina vista em fluorescência mostra um adelgaçamento destas nos neurofibromas (Figura 2B), quando comparados com a pele suprajacente (Figura 2A), bem como uma distribuição menos compacta para os neurofibromas (Figura 2B).

A coloração com a técnica de impregnação argêntica mostra uma certa diminuição das fibras de colágeno do tipo III (reticulares) nos neurofibromas (Figura 3B) em comparação com a pele suprajacente (Figura 3A), porém não estatisticamente significativa (Reticular na Tabela 1).

Quando as mesmas fibras são quantificadas pela coloração com picrosirius-hematoxilina vista em luz polarizada (Colágeno III na Tabela 1) a diminuição torna-se estatisticamente significativa.

Nesta coloração as mesmas aparecem em birrefringência verde (Figuras 4A e B).

A mesma técnica da coloração com picrossirius-hematoxilina analisada em luz polarizada mostra fibras em birrefringência com um espectro de cores que vai do amarelo ao vermelho (Figuras 4A e B), que correspondem ao colágeno do tipo I. Quantificado o colágeno do tipo I (Colágeno na Tabela 1) no neurofibroma está significativamente em menor quantidade do que na pele suprajacente, mas quando comparado com as demais fibras o mesmo predomina também no neurofibroma (Tabela 1).

Discussão

Segundo Peltonen et al. (1986)²⁰, a densidade celular, a quantidade de colágeno e de glicosaminoglicanas e proteoglicanas (material mucinoso) varia entre diferentes neurofibromas e também dentro de um mesmo neurofibroma, e alguns neurofibromas contêm uma abundância de material mixomatoso e, nestes casos, a proporção de células e colágeno está diminuída, respectivamente. Em 1995 Enzinger e Weiss¹ corroboraram, histologicamente, que os neurofibromas variam na dependência de seu conteúdo em células, glicosaminoglicanas/proteoglicanas e colágeno. Em sua forma mais característica o neurofibroma contém células alongadas com núcleos hiper cromáticos, intimamente associadas com colágeno e com pequena a moderada quantidade de material mixóide/mucóide (glicosaminoglicanas/proteoglicanas) separando as células e o colágeno. Menos frequentemente o neurofibroma é muito celular e consiste de células dispostas numa matriz colágena uniforme e desprovida de glicosaminoglicanas /proteoglicanas e ainda podem ser altamente mixóides, ou seja, hipocelulares e com grande quantidade de proteoglicanas ácidas entre as células dispersas, sendo que esta forma usualmente ocorre em extremidades.

Poucas, ou nenhuma, fibras elásticas foram demonstradas seja por meios estruturais (Verhoeff – van Gieson) ou bioquímicos (usando a desmosina como marcador, um composto presente em fibras elásticas insolúveis)²¹.

Nossos resultados mostraram a existência de fibras elásticas nos neurofibromas com uma frequência relativa sem diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com a pele suprajacente. O adelgaçamento destas nos neurofibromas, quando comparados com a pele suprajacente, e uma distribuição menos compacta, vistas na avaliação das mesmas na coloração com hematoxilina-eosina analisada em fluorescência poderia deixá-las menos detectáveis e explicar os resultados da literatura apresentados até então. Por outro lado, considera-se a possibilidade de que os autores²¹ tenham examinado apenas neurofibromas altamente mixóides, dada a pequena casuística dos mesmos (9 neurofibromas) e que a nossa casuística, significativamente maior (31 casos), mostre a real constituição química dos neurofibromas no tocante à presença de fibras elásticas: presentes em quantidade comparável ao que pode ser visto na pele, porém mais delgadas e com distribuição menos compacta.

A marcação dos neurofibromas com anticorpos para os colágenos tipo I e III demonstra que ambos são os principais

constituintes da matriz do tumor¹³. Outros dados imunocitoquímicos indicam que os neurofibromas contêm colágenos tipos I, III, IV e V e que a distribuição do colágeno tipo III nos tumores é muito similar a do colágeno tipo I²⁰.

A proporção de colágeno do tipo III em relação à somatória dos tipos I e III varia de 17,4 a 37,3% nas amostras de neurofibromas, quando estimados bioquimicamente. Os valores correspondentes para amostras de pele são consideravelmente menores (9,8 a 14,3%). Isto é consistente com o fato de que a maioria dos tecidos em desenvolvimento possui um conteúdo maior de colágeno tipo III²⁰. Já para Uitto e cols.²¹ fibras reticulares (colágeno tipo III) não foram detectadas pela técnica de impregnação pelo nitrato de prata. Nos neurofibromas estudados no presente trabalho há uma diminuição das fibras colágenas tipo III comparadas com a pele suprajacente, não significativa quando avaliada pela técnica da impregnação argêntica, mas, significativa quando avaliada pela picrossirius-hematoxilina em luz polarizada, mostrando que esta última se constitui numa técnica mais sensível que a impregnação argêntica. A proporção do colágeno do tipo III em relação ao colágeno do tipo I varia de 5,4 a 6,2% quando estimados do ponto de vista de frequência relativa, valores muito menores do que os demonstrados pela estimativa bioquímica²⁰, mostrando uma maior acuracidade do método bioquímico.

Do ponto de vista estrutural neurofibromas contêm uma abundante matriz extracelular consistindo predominantemente de colágeno²¹ e o colágeno tipo I é encontrado como uma malha contínua através do tecido do neurofibroma²⁰.

O padrão de fluorescência, de fato, reflete o padrão ondulado das finas fibras colágenas do estroma do tumor, tal como é visto em cortes histológicos convencionais¹³.

A análise bioquímica quantitativa usando a hidroxiprolina como marcador indicou que a predominância de colágeno, cerca de 70%²¹.

A expressão de genes para procolágeno em neurofibromas foi detectada por métodos para RNAm de colágenos dos tipos I, III e IV. Os níveis de RNAm específico para procolágeno do tipo I são cerca de 10 vezes mais abundantes que os níveis de RNAm para procolágenos do tipo III e IV. O crescimento e o desenvolvimento dos neurofibromas parecem ser dependentes da expressão contínua dos genes para colágeno²¹. Embora os neurofibromas sejam, em geral, predominantemente ricos em colágeno, é desnecessário invocar a presença de fibroblastos para explicar a formação de colágeno já que existem amplas evidências indicando que os neurolemócitos (células de Schwann) são capazes de sintetizar procolágeno²². Muitos neurolemócitos, imunocitoquimicamente positivos para a proteína S-100, parece ser o padrão celular típico dos neurofibromas, sejam eles cutâneos ou plexiformes².

O colágeno total dos neurofibromas varia entre 30 a 50% do peso seco. Isto corresponde à metade do valor correspondente da pele, mas duas vezes o valor descrito para o endoneuro humano²⁰. Nossos dados corroboram que o colágeno do tipo I está nos neurofibromas, significativamente do ponto de vista estatístico, em menores quantidades que na pele, porém não metade, mas algo em torno de uma redução de 30%. Esta

diferença pode ser explicada pelo fato de que a técnica da hematoxilina-picosirius em polarização não foi usada antes na análise dos neurofibromas além da questão casuística, já anteriormente mencionada.

Conclusões

A fibras elásticas estão presentes em quantidade comparável ao que pode ser visto na pele, porém mais delgadas e com distribuição menos compacta. As fibras colágenas do tipo III (reticulares) estão presentes em quantidades menores do que na pele suprajacente, sendo que esta diminuição é estatisticamente significativa e as fibras colágenas do tipo I estão presentes em quantidades menores do que na pele suprajacente, sendo que esta diminuição é estatisticamente significativa e as mesmas são o componente fibrilar predominante dos neurofibromas.

Referências bibliográficas:

1. Enzinger FM, Weiss SW. Benign Tumors of Peripheral Nerves. IN: Soft Tissue Tumors (3rd Edition). St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1995, pp. 853.
2. Ponce MAZ, Wysocki AD, Pavarino-Bertelli EC, André JC, Goloni-Bertollo EM. Análise imunocitoquímica do padrão celular de neurofibromas em neurofibromatose tipo 1 (NF1). Arq Ciênc Saúde 13(2): 82-86, 2006.
3. Carey JC, Viskochil DH. Neurofibromatosis type 1: A model condition for the study of the molecular basis of variable expressivity in human disorders. Am J Med Sc (Semin Med Genet) 89:7-13, 2007.
4. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. Am J Med Sc (Semin Med Genet) 89:1-6, 2008.
5. Trovó AB, Goloni-Bertollo EM, Tajara EH. Neurofibromatose tipo 1: uma revisão. HB Cient 9: 98-110, 2002.
6. Seizinger BR. NF1: A prevalent cause of tumorigenesis in human cancer? Nat Genet 3: 97-99, 2007.
7. Pummi KP, Aho HJ, Laato MK, Peltonen JTK, Peltonen SA. Tight junctions proteins and perineural cells in neurofibromas. J Histochem Cytochem 54(1): 53-61, 2007.
8. Odebo TO, Afolayan EAO, Adigun IA, Daramola OOM. Clinicopathological study of neurofibromatosis type 1: an experience in Nigéria. Int J Dermatol 44: 116-120, 2008.
9. Friedman JM. Neurofibromatosis 1: clinical manifestations and diagnostic criteria. J Child Neurol 17: 548-554, 2008.
10. Rosai J. Neurofibroma. IN: Ackerman's Surgical Pathology. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., pp. 2045, 2009.
11. Woodruff JM. Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type I neurofibromatosis. Am J Med Sc (Semin Med Genet) 89:23-30, 2007.
12. Peltonen J, Jaakkola S, Lebwohl M, Renvall S, Ristelli L, Virtanen I, et al. Cellular differentiation and expression of matrix genes in type I neurofibromatosis. Lab Invest 59(6): 760-771, 1988.
13. Weber L, Krieg Th. Basement membrane components in cutaneous neurofibroma of von Recklinghausen's disease. Arch Dermatol Res 276: 335-337, 1984.
14. Riccardi VM. Pathogenesis: cell biology. In: Guillevin L, ed. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis. London: The John Hopkins University Press, 2007, pp 258-279.
15. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 2008.
16. Goldfischer S, Coltoff-Schiller B, Schwratz E, Blumenfeld OO. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). J Histochem Cytochem 31: 382-390, 2008.
17. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani R. Picosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. J Histochem 11: 447-455, 1979.
18. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Laboratory Investigation 12: 131-155, 1978.
19. Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. Ahistoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. J Anatomy 3: 357-370, 1981.
20. Peltonen J, Penttinen R, Larjava H, Aho HJ. Collagen in neurofibromas and neurofibroma cell cultures. A New York A Sciences 486: 260-270, 1986.
21. Uitto J, Matsuoka LY, Chu M-L, Pihlajaniemi T, Prockop DJ. Connective tissue biochemistry of neurofibromas. A New York A Sciences 486: 271-286, 1986.
22. Erlandson RA, Woodruff JM. Peripheral nerve sheath tumors: an electron microscopic study of 43 cases. Cancer 49: 273-287, 2007.

Figuras:

Figura 1: Coloração pela resorcina-fucsina com oxidação prévia em pele suprajacente ao tumor (e – epiderme, d – derme, n – neurofibroma) (A) e neurofibroma cutâneo (B), mostrando fibras elásticas (setas).

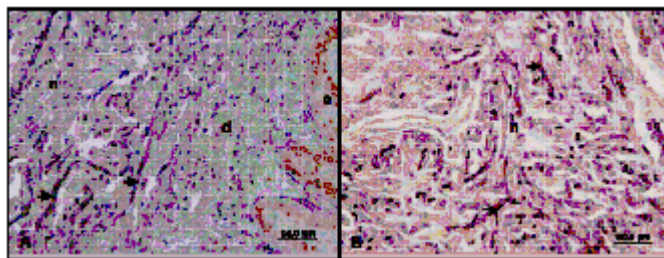


Figura 2: Coloração pela hematoxilina-eosina vista em fluorescência em pele suprajacente ao tumor (e – epiderme, d – derme, n – neurofibroma) (A) e neurofibroma cutâneo (B), mostrando fibras elásticas (setas).

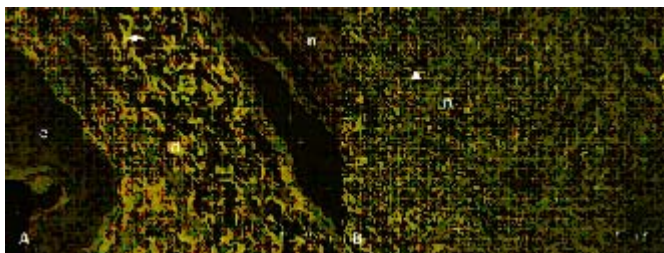


Figura 3: Coloração pela impregnação argêntica em pele suprajacente ao tumor (e – epiderme, d – derme, n – neurofibroma) (A) e neurofibroma cutâneo (B), mostrando fibras colágenas do tipo III ou reticulares (seta).

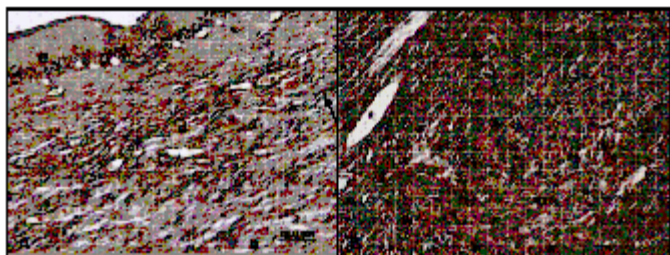


Figura 4: Coloração pelo tricromo da picosirius-hematoxilina vista em luz polarizada em pele suprajacente ao tumor (e – epiderme, d – derme, n – neurofibroma) (A) e neurofibroma cutâneo (B), mostrando fibras colágenas do tipo I, com espectro de cores que varia do amarelo ao vermelho e fibras colágenas do tipo III ou reticulares, esverdeadas.

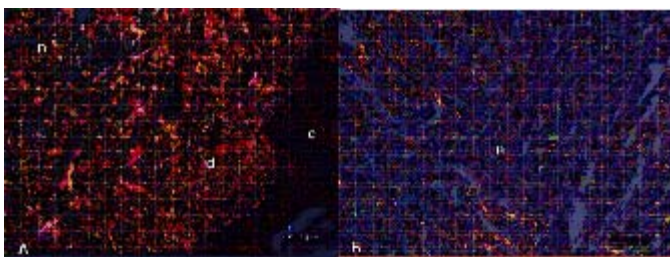


Tabela 1: Frequência Relativa dos Componentes Fibrilares de Regiões de Pele Suprajacente ao tumor e Neurofibroma

Fibras (%)	Pele Normal	Neurofibroma
Elástica	0,5± 0,8	0,7 ± 1,0
Reticular	1,9± 1,7	1,5 ± 1,4
Colágeno*	39,3 ± 11,8	27,6± 9,6
Colágeno III*	2,8± 2,2	1,7 ± 1,4

Os valores mencionados correspondem à média e ao desvio padrão. Asterisco (*) indicadiferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, p =0,05).

Correspondência

Ana Luiza Magnabosco
 Rua Francisco Gigliotti, 160 – apto. 41 – Bairro Santa Cândida
 15091-280 - São José do Rio Preto – SP
 Tel: (17) 3021-4746 / (17) 8123-2300
 e-mail: lumagnabosco@yahoo.com.br