

Análise imunocitoquímica do padrão celular de neurofibromas em neurofibromatose tipo 1 (NF1)

Immunocytochemistry analysis of neurofibroma cell patterns in neurofibromatosis type 1 (NF1)

Maria Amélia Z. Ponce¹; Anneliese D. Wysocki¹; Érika C. Pavarino-Bertelli²; Júlio C. André³; Eny M. Goloni-Bertollo⁴

¹Acadêmica do 3º ano de Enfermagem*; ²Professora Adjunta**; ³Professor Adjunto do Departamento de Anatomia e Disciplina de Histologia*;

⁴Professora Adjunta, Livre Docente**

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

**Departamento de Biologia Molecular e Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM da FAMERP

Resumo Neurofibromas múltiplos são as mais importantes características da NF1, uma das desordens genéticas autosômicas dominantes mais frequentes no ser humano. Analisaram-se biópsias de 25 pacientes acometidos por NF1, investigando-se as variações no padrão celular dos diferentes neurofibromas, por meio de marcadores imunocitoquímicos para células de origem neuroectodérmica: S-100, GFAP e Ck35. As células dos neurofibromas mostraram-se positivas para S-100 (++++), GFAP (++) e Ck35 (+). Não houve diferenças no padrão de imunopositividade entre os diferentes tipos de neurofibromas do mesmo paciente (diferença focal heterotópica), assim como no mesmo tipo de neurofibroma entre os diferentes pacientes (variação individual).

Palavras-chave Neurofibromas; Neurofibromatose 1; Imunocitoquímica; Padrão celular; S-100; GFAP; Ck35

Abstract Multiple Neurofibromas are the most important characteristics of Neurofibromatosis 1 (NF 1), one of the most frequent autosomal dominant gene disorders in human beings. The biopsies of 25 patients with NF 1 were analyzed. Cell pattern changes in different neurofibromas were observed by means of immunocytochemical markers for neuroectodermal cells: S-100, GFAP and Ck35. The neurofibromas cells were positive for S-100 protein (++++), GFAP (++) and Ck35 (+). There were no differences in the immunopositivity pattern among the different types of neurofibromas in the same patient (heterotopic focal difference) as well as in the same type of neurofibroma in different patients (individual variation).

Keywords Neurofibromas; Neurofibromatosis 1; Immunocytochemistry; Cell pattern; S-100; GFAP; Ck35

Introdução

A Neurofibromatose (NF) é uma anormalidade neuroectodérmica¹, cujas manifestações clínicas comprometem, principalmente, a pele, os olhos, os ossos, o sistema nervoso e, eventualmente, outros órgãos internos². Tem padrão de herança autossômica dominante com alta penetrância e expressividade variável³. Segundo estatísticas internacionais^{2,4,5}, aproximadamente metade dos casos possui história familiar, enquanto a outra metade dos casos descritos surgiu em decorrência de mutações espontâneas⁶.

A Neurofibromatose do tipo 1 (NF1), atualmente, é aceita como uma das doenças genéticas mais comuns, apresentando frequência populacional de 1 em cada 3000 nascimentos. Atinge ambos os sexos e todas as raças igualmente⁷.

As principais manifestações clínicas da doença são: neurofibromas cutâneos, manchas café-com-leite, nódulos de Lisch e efélides axilares e/ou inguinais^{6,8,9}.

Os neurofibromas são as lesões mais típicas da doença¹⁰. Histo-

patologicamente são derivados de vários tipos celulares, incluindo as células de Schwann, os neurônios, os fibroblastos, os mastócitos, os linfócitos, as células endoteliais, as perineurais e outras¹¹. Localizam-se no tecido cutâneo e subcutâneo e podem estender-se ao longo do trajeto de um nervo e acometer múltiplos fascículos nervosos ou grandes ramos de um nervo sendo, nesse último caso, denominados plexiformes^{12,13}.

Os neurofibromas cutâneos aparecem frequentemente após a pré-adolescência e tornam-se numerosos na idade adulta, com aumento da velocidade de crescimento durante a gravidez, mas não possuem potencial para transformação maligna^{12,14}. Geralmente são lesões assintomáticas, raramente provocam dor e, algumas vezes, podem causar prurido^{14,15}. Movem-se junto com a pele, apresentando textura amolecida e, apesar de serem tumores benignos, podem comprometer funções vitais como a audição e a visão por compressão nervosa^{6,9,16}.

Os subcutâneos, ao contrário, são profundos na pele e mostram consistência firme, enquanto os plexiformes apresentam-se flá-

Não há conflito de interesse

Apoio Financeiro: Bolsa de Iniciação Científica – BIC/FAMERP

cido, embora, ocasionalmente, exibam fibras de nervos hipertrofiados no seu interior¹⁷. Estes últimos são, em sua maioria, congênitos e podem sofrer transformação maligna para neurofibrossarcoma em 2 a 5% dos casos¹⁸.

Macroscopicamente, a aparência do neurofibroma varia de uma lesão para outra. Microscopicamente, são formados por uma proliferação de todos os elementos de um nervo periférico: axônios, neurolemócitos, fibroblastos e, no tipo plexiforme, células perineurais. A presença de axônios pode ser demonstrada por impregnação pela prata, testes histoenzimáticos para acetilcolinesterase ou por detecção imunocitoquímica para enolase neurônio-específico, neurofilamentos ou vários neuropeptídeos. Os neurolemócitos são predominantes e imunoreativos para a proteína S-100¹⁹.

A histologia dos neurofibromas tem sido descrita em detalhes usando a microscopia de luz com ajuda de diferentes técnicas de coloração e impregnação. Alguns estudos genéricos foram orientados buscando a determinação da origem do componente celular predominante e das características do estroma do tumor^{20,21}. Entretanto, o uso de diferentes técnicas no estudo da natureza básica dos neurofibromas, suas alterações em diferentes momentos de evolução e a resposta dos mesmos à diferentes tratamentos, são elementos que ainda podem ser explorados²² e que delinearão os objetivos deste estudo: evidenciar a existência ou não de variações no padrão celular dos diferentes tipos de neurofibromas de um mesmo paciente (diferenciação focal heterotópica) e do mesmo tipo de lesão em diferentes pacientes (variação individual), por meio da análise histológica, com marcadores imunocitoquímicos, das lesões de pacientes com NF1.

Casuística e Métodos

Vinte e cinco pacientes portadores de NF1, de diferentes famílias, cadastrados pelo CEPAN (Centro de Pesquisa e Atendimento em Neurofibromatose) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Autarquia Estadual/Famerp e Hospital de Base/Funfarme, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, submetem-se à biópsia para coleta de amostras de neurofibromas cutâneos e/ou plexiformes. O material obtido, após fixação em formalina neutra tamponada a 10%, foi incluído em parafina. Cortes histológicos de 4 a 5 mm foram montados em lâminas salinizadas e incubados com anticorpos primários em diluições mostradas no Quadro 1, acrescidos de albumina sérica bovina – fração V (BSA – V) a 1%, por 18 horas a 4°C. As reações foram realizadas pelo método peroxidase-antiperoxidase (PAP) e

reveladas pelo uso de DAB (3,3' – diaminobenzidina tetrahidroclorido). Para cada um dos anticorpos primários em todas as baterias incluiu-se um controle positivo correspondente. Embora a especificidade de cada anticorpo primário seja assegurada pelo fabricante, um controle negativo, utilizando-se soro normal ao invés do primeiro anticorpo, também correu em cada bateria. Os anticorpos primários usados foram: S-100, GFAP e Ck35. Informações complementares sobre os anticorpos primários podem ser vistas no Quadro 1, assim como os tratamentos prévios e os respectivos controles positivos.

Os resultados da reação imunocitoquímica foram classificados qualitativamente, com base na quantidade de células positivas, em positivo (++++, +++, ++ e +), questionável (+/-) e negativo (-).

Resultados

Os resultados da análise da reação imunocitoquímica dos diferentes anticorpos nos neurofibromas cutâneos e plexiformes dos pacientes estudados estão sumarizados no Quadro 2. Ambos os neurofibromas, cutâneos e plexiformes, são positivos (++++) para S-100 (Figura 1), para proteína ácida fibrilar glial – GFAP (++) (Figura 2) e para a citoqueratina 35 - Ck35 (+) (Figura 3). A imunopositividade é de localização intracelular. Não há diferenças na intensidade e na extensão (quantidade de células) da positividade entre os neurofibromas cutâneos e plexiformes de um mesmo paciente e nem tampouco entre os neurofibromas cutâneos e/ou plexiformes de diferentes pacientes. Considerando a imunopositividade como um marcador do tipo celular (neurolemócitos = positivos para S-100 e GFAP e algumas células não determinadas positivas para CK 35) não há evidências de diferenças no padrão celular dos diferentes neurofibromas de um mesmo paciente (variação focal heterotópica) e do mesmo tipo de neurofibroma em diferentes pacientes (variação individual).

Discussão

A NF1 afeta predominantemente tecidos derivados do ectoderma neural¹ o que explica os tipos celulares encontrados nos neurofibromas que são neurolemócitos, fibroblastos e células perineurais, inseridas numa abundante matriz extracelular^{23,24,25,26}. A imunocitoquímica tem se constituído numa ferramenta imprescindível para o diagnóstico histológico de neurofibromas e outras alterações histológicas²⁷.

O fato da maior parte das células dos neurofibromas serem po-

Quadro 1: Descrição Geral das Reações Imunocitoquímicas

Anticorpo para	Fornecedor	Clone	Diluição de Trabalho	Tratamentos Prévios		Material de Controle Positivo
				1	2	
Proteína S-100	Dako (BR)	policlonal	1:200	Solução tampão de citrato, por 20 minutos, a 96°C	H ₂ O ₂ a 3%, por 30 minutos, a temperatura ambiente	Astrocitoma
GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial)	Dako (BR)	6F ₂ 1	1:40	Solução tampão de citrato, por 20 minutos, a 96°C	H ₂ O ₂ a 3%, por 30 minutos, a temperatura ambiente	cérebro humano
CK-35 (Citoqueratina 35)	Dako (BR)	35βH ₁₁	1:100	Solução tampão de citrato, por 20 minutos, a 96°C	H ₂ O ₂ a 3%, por 30 minutos, a temperatura ambiente	intestino humano

Quadro 2: Resultado da Análise das Reações Imunocitoquímicas para a Presença de Diferentes Proteínas em Neurofibromas de Pacientes Portadores de NF1

CASO	TIPO DE NEUROFIBROMA	S-100 (**)	GFAP (**)	CK-35 (**)
02	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
03	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
04	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
05	Cutâneo	++++	++	+
06	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
09	Cutâneo	++++	++	+
13	Cutâneo	++++	++	+
14	Cutâneo	++++	++	+
15	Cutâneo	++++	++	+
16	Cutâneo	++++	++	+
18	Cutâneo	++++	++	+
19	Cutâneo	++++	++	+
20	Cutâneo	++++	++	+
22	Cutâneo	++++	++	+
25	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
27	Cutâneo	++++	++	+
28	Cutâneo	++++	++	+
29	Cutâneo	++++	++	+
30	Cutâneo	++++	++	+
	Plexiforme	++++	++	+
32	Cutâneo	++++	++	+
33	Cutâneo	++++	++	+
34	Cutâneo	++++	++	+
36	Cutâneo	++++	++	+
37	Cutâneo	++++	++	+
38	Cutâneo	++++	++	+

(**) Os resultados foram expressos em -, -/+, +, ++, +++ e ++++ de acordo com a quantidade de células positivas para a reação em questão.

Figura 1: Reação imunocitoquímica positiva (++++) para proteína S-100 em neurofibroma cutâneo. (X 100)

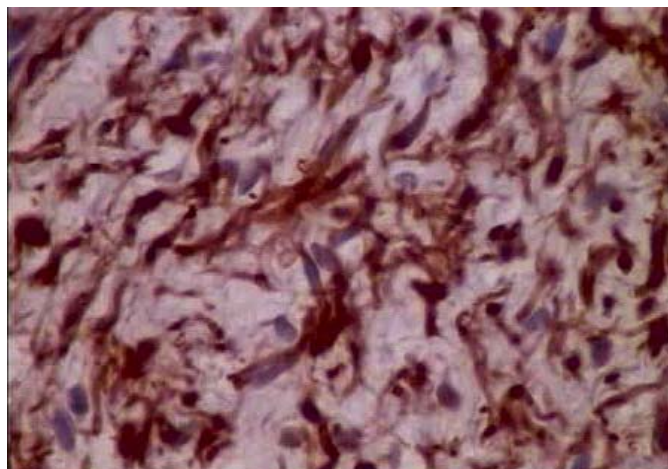


Figura 2: Reação imunocitoquímica positiva (++) para proteína GFAP em neurofibroma cutâneo. (X 400)

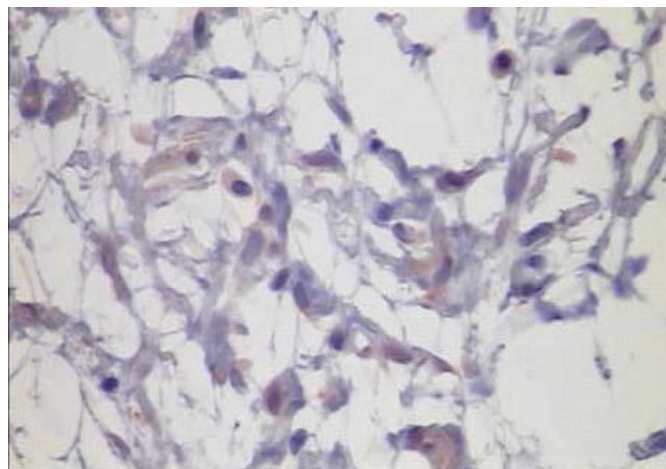
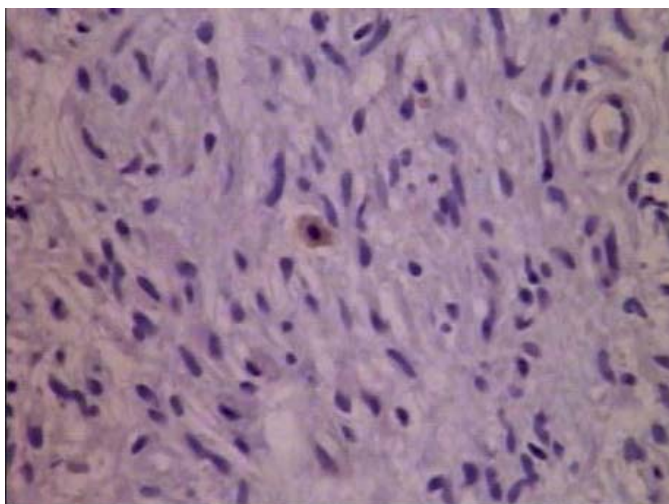


Figura 3: Reação imunocitoquímica positiva (+) para proteína Ck35 em neurofibroma cutâneo (x 100).



positivas para a proteína S-100, importante componente de neurolemócitos, está em conformidade com resultados morfológicos, imunocitoquímicos^{28,29} e eletroforéticos³⁰ anteriormente descritos. Culturas celulares combinadas com estudos eletroforéticos mostram que as células positivas para S-100 são de origem neuroglial, mais especificamente neurolemócitos. Distintos dos fibroblastos com base em critérios morfológicos e ultraestruturais, os neurolemócitos em cultura primária de neurofibromas periféricos expressam a proteína S-100, mas não expressariam a GFAP^{28,30}. O fato de não expressarem GFAP em cultura se deve a condição “imatura” que estas células apresentam *in vitro*²⁸. A pouca quantidade de células positivas para GFAP(++) são condizentes com esses dados. Um número muito reduzido de células se apresentam positivas para a citoqueratina 35 – Ck-35 (+), o que está de acordo com dados previamente descritos para uma população de células Ck34 positivas¹⁹, cuja natureza e relação histogenética com os constituintes de neurofibromas não está clara.

A positividade à proteína S-100 parece se constituir em um marcador eficiente para a detecção de células neurogliais e, portanto, de origem neuroectodérmica³¹. As células do nódulo de Lisch também são positivas para S-100³². Um estudo imunocitoquímico realizado com neuroblastomas e tumores correlatos³³, usando a proteína S-100, concluiu que a positividade para a mesma provê um método objetivo aceitável para avaliação da diferenciação das células desses tumores, constituindo-se num importante fator de bom prognóstico, o que se aplica aos neurofibromas que são tumores benignos e que muito raramente se malignizam^{34,35,36,37,38,39}.

Muitas células S-100 positivas, algumas GFAP positivas e raras Ck-35 positivas parecem ser o padrão celular típico dos neurofibromas, sejam eles cutâneos ou plexiformes, embora neste último haja necessidade de ampliação da casuística para confirmação do padrão. Não há variações neste padrão em neurofibromas obtidos a partir de diferentes pacientes.

Agradecemos ao Domingos Zanchetta Netto pela colaboração no apoio técnico laboratorial

Referências Bibliográficas

1. Ponder BA. Neurofibromatosis: from gene to phenotype. *Semin Can-*

cer Biol 1992;3(3):115-20.

2. Ruggieri M. The different forms of neurofibromatosis. *Childs Nerv Syst* 1999;15(6-7):295-308.

3. Goloni-Bertollo EM, Bertelli ECP. Base genética da neurofibromatose. In: Geller M, Banalumi-Filho A, organizadores. *Neurofibromatose tipo I*. Rio de Janeiro; 2004. v. 1, p.77-89.

4

4. Mulvihill JJ, Parry DM, Sherman JL, Pikus A, Kaiser-Kupfer MI, Eldridge R. Neurofibromatosis I (Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). Na update. *Ann Intern Med* 1990;113(1):39-52.

5. Riccardi VM. Neurofibromatosis. Phenotype, natural history and pathogenesis. 2ª ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press; 1992.

6. Goloni-Bertollo EM, Antonio JR, Varela-Garcia M. Avaliação genético-clínica em neurofibromatose. *An Bras Dermatol* 1994;69(4):311-20.

7. Trovó AB, Goloni-Bertollo EM, Tajara EH. Neurofibromatose tipo 1: uma revisão. *HB Cient* 2002;9:98-110.

8. Azulay RD, Azulay DR. Genodermatoses e displasias cutâneas. In: _____ editores. *Dermatologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997. p.378-402.

9. Trovo-Marqui AB, Goloni-Bertollo EM, Valério NI, Pavarino-Bertelli ECP, Muniz MP, Teixeira MF et al. High frequencies of plexiform neurofibromas, mental retardation, learning difficulties and scoliosis in brazilian patients with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Braz J Med Biol Res* 2005;38(9):1441-7.

10. Enzinger FM, Weiss SW. *Soft tissue tumors*. 3ª ed. St Louis: Mosby-Yearbook; 1995. p.843-63.

11. Muniz MP. Lesões ósseas no diagnóstico de neurofibromatose [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2004.

12. Goloni-Bertollo EM. Estudo citogenético e genético-clínico em neurofibromatose [tese]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 1994.

13. Cunha GK. Aspectos odontológicos na neurofibromatose. In: Geller M, Banalumi-Filho A, organizadores. *Neurofibromatose tipo I*. Rio de Janeiro; 2004. p.90-5.

14. Lynch TM, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1. *Neurol Clin* 2002;20(3):841-65

15. Geller M, Banalumi-Filho A. Diagnóstico clínico e laboratorial na neurofibromatose. In: Geller M, Banalumi-Filho A, organizadores. *Neurofibromatose tipo I*. Rio de Janeiro; 2004. v.1, p.10-27.

16. Riccardi VM. Pathophysiology of neurofibromatosis. IV. Dermatological insights into heterogeneity and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 1980;3(2):157-66

17. Huson SM, Hughes RS. *The Neurofibromatosis: a pathogenetic and clinical overview*. New York: Chapman & Hall Medical; 1994.

18. Khong PL, Goh WH, Wong VC, Fung CW, Ooi GC. MR imaging of spinal tumors in children with neurofibromatosis 1. *AJR Am J Roentgenol* 2003;180(2):413-7

19. Rosai J. *Ackerman's surgical pathology*. 8ª ed. St Louis: Mosby-Yearbook; 1996. v.2. p.2045-9.

20. Peltonen J, Jaakkola S, Lebwohl M, Renvall S, Risteli L, Virtanen I et al. Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest* 1988;59(6):760-71.

21. Jaakkola S, Muona P, James WD, Hannuksela M, Karvonen J, Peltonen J et al. Segmental neurofibromatosis: immunocytochemical analysis of cutaneous lesions. *J Am Acad Dermatol* 1990;22(4):617-21.

22. Liew MA, Coffin CM, Fletcher JA, Hang MT, Tanito K, Niimura M et al. Peripheral nerve sheath tumors from patients with neurofibromatosis type 1 do not have the chromosomal translocation t(X;18). *Pediatr Dev Pathol* 2002 Mar-Apr;5(2):165-9.

23. Giorno R, Lieber J, Claman HN. Ultrastructural evidence for mast cell activation in a case of neurofibromatosis. *Neurofibromatosis* 1989;2(1):35-41

24. Riccardi VM. Mast-cell stabilization to decrease neurofibroma growth. Preliminary experience with ketotifen. *Arch Derma-*

tol 1987;123(8):1011-6.

25. Jaakkola S, Peltonen J, Riccardi V, Chu ML, Uitto J. Type 1 neurofibromatosis: selective expression of extracellular matrix genes by Schwann cells, perineurial cells, and fibroblasts in mixed cultures. *J Clin Invest* 1989;84(1):253-61.
26. Johnson MD, Kamso-Pratt J, Federspiel CF, Whetsell Jr. WO. Mast cell and lymphoreticular infiltrates in neurofibromas. Comparison with nerve sheath tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113(11):1263-70.
27. Murat A, Kansis F, Kabakus N, Kazez A, Ozercan R. Neurofibroma of the breast in a boy with neurofibromatosis type 1. *Clin Imaging* 2004;28(6):415-7.
28. Krone W, Jirikowski G, Muhleck O, Kling H, Gall H. Cell culture studies on neurofibromatosis (von Recklinghausen). II. Occurrence of glial cells in primary cultures of peripheral neurofibromas. *Hum Genet* 1983;63(3):247-51.
29. Peltonen J, Penttinen R, Larjava H, Aho HJ. Collagens in neurofibromas and neurofibroma cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1986;486:260-70.
30. Peltonen J, Foidart JM, Aho HJ. Type IV and V collagens in von Recklinghausen's neurofibromas. An immunohistochemical and electrophoretic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984;47(4):291-301.
31. Lasota J, Wasag B, Dansonka-Mieszkowska A, Karcz D, Millward CL, Rys J et al. Evaluation of NF2 and NF1 tumor suppressor genes in distinctive gastrointestinal nerve sheath tumors traditionally diagnosed as benign schwannomas: study of 20 cases. *Lab Invest* 2003 Sep;83(9):1361-71.
32. Lukacs A, Junk AK, Stefani FH, Kampic A, Schirren CG, Plewig G. Lisch nodules. Markers of neurofibromatosis 1 and immunohistochemical references for neuroectodermal differentiation. *Hautarzt* 1997;48(1):38-41.
33. Misugi K, Aoki I, Kikyo S, Sasaki Y, Tsunoda A, Nakajima T. Immunohistochemical study of neuroblastoma and related tumors with anti S-100 protein antibody. *Pediatr Pathol* 1985;3(2-4):217-26.
34. Takeuchi A, Ushigome S. Diverse differentiation in malignant peripheral nerve sheath tumours associated with neurofibromatosis-1: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histopathology* 2001;39(3):298-309.
35. Go JH. Benign peripheral nerve sheath tumor of the tongue. *Yonsei Med J* 2002 Oct;43(5):678-80.
36. Simsek E, Yavuz C, Ustundag N. Atypical meningioma and extensive calvarium defects in neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol* 2003;33(8):551-3.
37. Zhou H, Coffin CM, Perkins SL, Tripp Sr, Liew M, Viskochil DH. Malignant peripheral nerve sheath tumor: a comparison of grade, immunophenotype, and cell cycle/growth activation marker expression in sporadic and neurofibromatosis 1: related lesions. *Am J Surg Pathol* 2003;27(10):1337-45.
38. Cunha KS, Barboza EP, Dias EP, Oliveira FM. Neurofibromatosis type 1 with periodontal manifestation. A case report and literature review. *Br Dent J* 2004 Apr 24;196(8):457-60.
39. Laskin WB, Fetsch JF, Lasota J, Miettinen M. Benign epithelioid peripheral nerve sheath tumors of the soft tissues: clinicopathologic spectrum of 33 cases. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jan;29(1):39-51.

Correspondência

Eny Maria Goloni Bertollo
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Departamento de Biologia
Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM
Av. Brigadeiro Faria Lima, n.º 5416 – Bloco U6
15090-000 - São José do Rio Preto – SP
Tel: (17) 32015720/ 32015708
e-mail: eny.goloni@famerp.br
