

*MARIAM PATRÍCIA AUADA SOUTO*

**ESTUDO CLÍNICO-MOLECULAR E ANÁLISE DA  
TEXTURA EPIDÉRMICA DE PACIENTES COM  
SÍNDROME DE SJÖGREN-LARSSON**

*CAMPINAS*

*2006*

*MARIAM PATRÍCIA AUADA SOUTO*

**ESTUDO CLÍNICO-MOLECULAR E ANÁLISE DA  
TEXTURA EPIDÉRMICA DE PACIENTES COM  
SÍNDROME DE SJÖGREN-LARSSON**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Doutor em Clínica Médica. área de concentração em  
Clínica Médica.*

***Orientadora:*** Professora Dra. Maria Beatriz Puzzi

***Co-orientador:*** Professor Dr. Konradin Metze

**CAMPINAS**

**2006**

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA UNICAMP  
So89e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 71553  
PROC. 16.P.00145.07  
C \_\_\_\_\_ D \_\_\_\_\_  
PREÇO 11,00  
DATA 27/03/07  
BIB-ID 401628

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So89e Souto, Mariam Patrícia Auada  
Estudo clínico-molecular e análise da textura epidérmica de  
pacientes com Síndrome de Sjögren-Larsson / Mariam Patrícia Auada  
Souto. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores : Maria Beatriz Puzzi,  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Síndrome de Sjogren-Larsson. 2. Ictiose. 3. Mutação  
(Biologia). I. Puzzi, Maria Beatriz. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles : Molecular genetic study and texture analysis of the  
epidermis in patients with Sjorgren-Larsson Syndrome**

**Keywords:** • Sjorgren-larsson Syndrome  
• Ichthyosis  
• Mutation (Biology)

**Área de concentração : Clínica Médica**

**Titulação: Doutorado em Clínica Médica**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi**

**Profa. Dra. Antônia Paula Marques de Faria**

**Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes**

**Prof Dr Mauricio Mota de Avelar Alchorne**

**Prof Dr Ney Romitti**

**Data da defesa: 04-05-2006**

---

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

---

---

**Orientador(a): *Profa Dra. Maria Beatriz Puzzi***

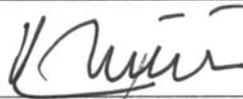
---

---

**Membros:**

---

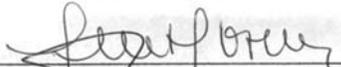
1. Prof(a). Dr(a) .Ney Romiti \_\_\_\_\_



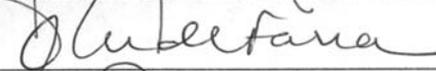
2. Prof(a). Dr(a). Mauricio Mota de Avelar Alchorne \_\_\_\_\_



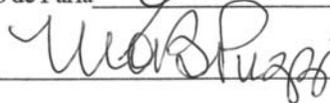
3. Prof(a). Dr(a). Aparecida Machado de Moraes \_\_\_\_\_



4. Prof(a). Dr(a). Antônia Paula Marques de Faria \_\_\_\_\_



5. Prof.(a). Dr(a). Maria Beatriz Puzzi \_\_\_\_\_



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 04/05/2006**

---

***DEDICATÓRIA***

*À minha mãe, Aglaé Terezinha Ribas.*

*“É no coração que a gente guarda tudo que é para sempre,  
tudo que o amor transformou em eterno...”*

## **AGRADECIMENTOS**

---

À minha orientadora, Profa. Dra Maria Beatriz Puzzi, pela amizade e confiança.

À Profa.Dra. Maria Letícia Cintra, pela orientação e pela atenção a mim dispensadas.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr Edgar Collares e Prof. Dr. Konradin Metzger pelo critério científico.

Ao Prof. Dr William B Rizzo, pela prontidão e participação ativa na revisão dos artigos publicados.

Ào meu pai Gazi Auada e à minha irmã Lailah Auada pelo amor e confiança.

Ao meu marido Luis Ricardo Martinhão Souto, também pelo amor e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner, pelo auxílio e apoio fundamentais.

Ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética –Unicamp (CBMEG), representado pela Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato e sua aluna de Doutorado Fabiana Alexandrino, pela contribuição neste estudo.

Ao Dr. Randall Luis Adam, por seus conhecimentos de computação e análise de textura empregados neste trabalho.

À Profa. Dra Verônica A Zanardi e à Profa. Dra Andréia Vasconcellos Faria, pela orientação no estudo de neuroimagem deste trabalho.

Ao Departamento de Clínica Médica, pela minha aceitação junto ao seu corpo docente.

Aos Professores da Disciplina de Dermatologia, pela minha formação e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Sr. Adilson Abílio Piazza, pela editoração deste estudo.

Aos pacientes deste estudo, pela confiança em mim depositada.

Aos funcionários da Disciplina de Dermatologia, pela amizade e disponibilidade.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,  
e de repente você estará fazendo o impossível”.*

**São Francisco de Assis**

|   | <b>PÁG.</b>   |
|---|---------------|
| <b>RESUMO</b> .....                             | <i>xxxiii</i> |
| <b>ABSTRACT</b> .....                           | <i>xxxvii</i> |
| <b>1- INTRODUÇÃO</b> .....                      | 41            |
| <b>1.1- Síndrome de Sjogren-Larsson</b> .....   | 43            |
| <b>1.2-Textura</b> .....                        | 44            |
| <b>2- OBJETIVOS</b> .....                       | 49            |
| <b>2.2- Objetivos gerais</b> .....              | 51            |
| <b>2.3- Objetivos específicos</b> .....         | 51            |
| <b>3- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....           | 53            |
| <b>3.1- As ictioses</b> .....                   | 55            |
| <b>3.2- Síndrome de Sjogren-Larsson</b> .....   | 56            |
| 3.2.1- Aspectos históricos e epidemiologia..... | 56            |
| 3.2.2- Manifestações dermatológicas.....        | 57            |
| 3.2.3- Manifestações neurológicas.....          | 58            |
| 3.2.4- Manifestações oftalmológicas.....        | 59            |
| 3.2.5- Outras manifestações.....                | 60            |
| 3.2.6- Neuroimagem.....                         | 60            |
| 3.2.7- Histopatologia.....                      | 61            |
| 3.2.8- Fisiopatologia.....                      | 61            |
| 3.2.8.1- Álcool graxo.....                      | 62            |
| 3.2.9- Diagnóstico pré-natal.....               | 67            |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.10- O Gene da FALDH.....  | 67         |
| 3.2.11- Terapêutica.....  | 70         |
| <b>4- MÉTODOS.....</b>  | <b>73</b>  |
| <b>4.1- Aspectos éticos.....</b>  | <b>75</b>  |
| <b>4.2- Casuística.....</b>   | <b>75</b>  |
| <b>4.3- Estudo clínico.....</b>   | <b>75</b>  |
| <b>4.4- Estudo de neuroimagem.....</b>                                  | <b>76</b>  |
| <b>4.5- Estudo do DNA genômico.....</b>                                 | <b>77</b>  |
| 4.5.1- Amplificação dos exons.....                                      | 77         |
| 4.5.2- Sequenciamento automático.....                                   | 77         |
| 4.5.3- Análise das seqüências obtidas.....                              | 79         |
| <b>4.6- Análise da textura epidérmica.....</b>                          | <b>81</b>  |
| 4.6.1- Aquisição de imagens.....  | 81         |
| 4.6.2- Pré-processamento das imagens (Transformada de Fourier).....     | 81         |
| 4.6.3- A Imagem transformada.....                                       | 84         |
| 4.6.4- Extração de características a partir da imagem transformada..... | 86         |
| <b>5- RESULTADOS.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>5.1- Estudo clínico.....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>5.2- Caracterização molecular.....</b>                               | <b>97</b>  |
| <b>5.3- Estudo neuroimagem.....</b>                                     | <b>99</b>  |
| 5.3.1- Ressonância magnética.....                                       | 99         |
| 5.3.2- Espectroscopia.....  | 101        |
| <b>5.4- Textura epidérmica.....</b>                                     | <b>104</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>6- DISCUSSÃO</b> .....   | 113 |
| <b>7- CONCLUSÕES</b> .....  | 125 |
| <b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 129 |
| <b>9-ANEXOS</b> .....   | 141 |
| <b>Anexo 1-</b> Resumo das principais ictioses.....   | 143 |
| <b>Anexo 2-</b> Aprovação do Comitê de Ética.....   | 147 |
| <b>10- APÊNDICES</b> .....  | 149 |
| <b>Apêndice 1-</b> Auada MP, Taube MB, Collares EF, Tanaka AM, Cintra ML.<br>Sjögren -Larsson syndrome:biochemical defects and follow up<br>in three cases. Eur J Dermatol 2002; 12(3):263-6.....   | 151 |
| <b>Apêndice 2-</b> Auada MP, Puzzi MB, Cintra ML, Steiner CE, Alexandrino F,<br>Sartorato EL, Aguiar TS, Azulay RD, Carney G, Rizzo WB.<br>Sjogren-Larsson syndrome in Brazil is caused by a common<br>c.1108-1G>C splice-site mutation in the ALDH3A2 gene. Br J<br>Dermatol 2006; 154(4):770-3..... | 155 |
| <b>Apêndice 3-</b> Epidermal texture analysis in Sjögren-Larsson syndrome, a ser<br>publicado: "Analytical and Quantitative Cytology and<br>Histology".....   | 159 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| A                  | Adenina - base nitrogenada no DNA e RNA  |
| ALDH3A2            | Gene onde mutações são responsáveis pela Síndrome de Sjögren-Larsson   |
| ALDHs              | Família de enzimas das aldeído - desidrogenases  |
| cDNA               | DNA complementar após transcrição  |
| C                  | Citosina- base nitrogenada no DNA ou RNA   |
| °C                 | Temperatura em graus Celsius   |
| Col                | Colina   |
| Cre                | creatina   |
| CBMEG              | Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética   |
| DNA                | Ácido desoxirribonucléico, molécula que é a base do material genético encontrado em todas as células.  |
| <i>Dde I</i>       | Enzima de restrição- enzima que reconhece uma seqüência específica de bases em uma molécula de DNA e cliva a molécula naquela seqüência ou próximo a ela. A seqüência de reconhecimento é chamada de sítio de restrição. Diferentes enzimas de restrição reconhecem e clivam diferentes sítios de restrição. |
| EDTA               | ácido etilenodiaminotetracético  |
| ERM <sup>1</sup> H | Espectroscopia de Hidrogênio por Ressonância Magnética   |
| FADH               | Enzima álcool graxo desidrogenase  |
| FALDH              | Enzima aldeído graxo desidrogenase   |
| FAO                | Complexo enzimático composto pela FADH e FALDH   |
| FCM                | Faculdade de Ciências Médicas  |
| FFT                | Fast Fourier Transform   |
| HE                 | Hematoxilina/Eosina  |

|                  |   |
|------------------|---|
| G                | Guanina-base nitrogenada encontrada no DNA ou RNA |
| H <sub>2</sub> O | água  |
| Lip              | Lipídeos  |
| LTB <sub>4</sub> | Leucotrienos                                      |
| min              | Minutos   |
| mm               | milímetros  |
| μl               | Microlitros                                       |
| NAA              | N-Acetil Aspartato                                |
| NAD              | Nicotinamida Dinucleotídeo                        |
| Ng               | nanograma   |
| OMIM             | On line Mendelian Inheritance In Man              |
| PCR              | Reação de Cadeia da Polimerase                    |
| Pb               | Pares de base                                     |
| Ppm              | partes por milhão                                 |
| RM               | Ressonância magnética                             |
| RNA              | Ácido ribonucléico                                |
| Rpm              | Rotações por minuto                               |
| Seg              | Segundos  |
| SLSD             | primer utilizado direto                           |
| SLSR             | primer utilizado reverso                          |
| SNPs             | single nucleotide polymorphism                    |
| SSL              | Síndrome de Sjögren-Larsson                       |
| T                | Tiamina-base nitrogenada encontrada no DNA        |
| RNA              | complementar                                      |
| U                | Uracila- Base Nitrogenada encontrada no RNA       |
| Unicamp          | Universidade Estadual de Campinas                 |

## *LISTA DE TABELAS*

---

|  | <i>PÁG.</i> |
|--|-------------|
| <b>Tabela 1-</b> Sequência de primers para amplificação do gene ALDH3A2.....   | 80          |
| <b>Tabela 2-</b> Características clínicas, histológicas e bioquímicas dos pacientes com SSL.....                         | 95          |
| <b>Tabela 3-</b> Achados de Ressonância Magnética de crânio dos pacientes com SSL.....                                   | 99          |
| <b>Tabela 4-</b> Resultado quantitativo de espectroscopia de crânio dos pacientes com SSL e dos pacientes controles..... | 101         |
| <b>Tabela 5-</b> Dados clínicos dos pacientes para o estudo histológico e vetor resultante (região 6).....               | 108         |

|   | <i>PÁG.</i> |
|---|-------------|
| <b>Figura 1-</b> Representação da imagem transformada de uma função harmônica.....                | 46          |
| <b>Figura 2-</b> Representação da imagem transformada de duas funções harmônicas.....             | 46          |
| <b>Figura 3-</b> Representação da imagem transformada de várias funções harmônicas.....           | 47          |
| <b>Figura 4-</b> Estrutura química dos álcoois graxos e seus derivados.....                       | 64          |
| <b>Figura 5-</b> Organização do gene ALDH3A2.....   | 70          |
| <b>Figura 6-</b> Ciclo utilizado na reação de sequênciamneto.....                                 | 78          |
| <b>Figura 7-</b> Imagem original da camada espinhosa corada em HE.....                            | 82          |
| <b>Figura 8-</b> Filtro de média para ser aplicado na imagem original (7).....                    | 83          |
| <b>Figura 9-</b> Imagem original já em tons de cinza e filtrada pronta para ser transformada..... | 84          |
| <b>Figura 10-</b> Imagem transformada.....  | 85          |
| <b>Figura 11-</b> Imagem transformada indicando as direções horizontal e vertical.....            | 86          |
| <b>Figura 12-</b> Segundo filtro utilizado na imagem.....   | 87          |
| <b>Figura 13-</b> Imagem original e imagem filtrada.....  | 88          |
| <b>Figura 14-</b> Cálculo do Vetor resultante.....  | 89          |
| <b>Figura 15-</b> Apresentação clínica dos pacientes.....   | 94          |
| <b>Figura 16-</b> Resultado do sequenciamento do gene e PCR.....                                  | 98          |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Figura 17-</b> | Ressonância Magnética de crânio dos pacientes afetados com SSL.....                              | 100 |
| <b>Figura 18-</b> | Espectroscopia de substância branca de paciente afetado com SSL.....                             | 102 |
| <b>Figura 19-</b> | Comparação da epiderme de pele normal e da pele de paciente com SSL (HEX64).....                 | 105 |
| <b>Figura 20-</b> | Comparação da camada espinhosa de pele normal acima e de pele de paciente com SSL (HE1000x)..... | 106 |

|  | <i>PÁG.</i> |
|--|-------------|
| <b>Gráfico 1-</b> Valores relativos de NAA/CR e Col/Cre-pacientes com SSL e controles.....           | 103         |
| <b>Gráfico 2-</b> Resultado dos valores das amplitudes de função harmônica na região horizontal..... | 109         |
| <b>Gráfico 3-</b> Resultado dos valores das amplitudes de função harmônica na região vertical.....   | 110         |
| <b>Gráfico 4-</b> Vetor resultante das regiões 4 e 6.....  | 111         |

## *LISTA DE FÓRMULAS*

---

|  | <i>PÁG.</i> |
|--|-------------|
| <b>Fórmula 1-</b> Cálculo do comprimento do vetor resultante das amplitudes de frequência da função harmônica..... | 89          |
| <b>Fórmula 2-</b> Cálculo do valor de cinza do pixel na FFT.....   | 89          |

*RESUMO*



A síndrome de Sjögren-Larsson (SSL) é uma ictiose congênita com alterações neurológicas decorrentes da deficiência enzimática da enzima aldeído graxo desidrogenase (**FALDH**). Mutações no gene *ALDH3A2* são responsáveis pela doença. A proposta foi estudar os aspectos clínicos, histológicos, estruturais e moleculares de dez pacientes com SSL. **Métodos:** Foram selecionados dez pacientes com SSL de quatro famílias distintas. Foi realizada ressonância magnética cerebral (RM) em oito pacientes e, em sete destes, também espectroscopia de prótons; os resultados foram comparados com a espectroscopia de sete voluntários sadios. Foram coletadas biópsias de pele de cada paciente e pele de 17 voluntários. Os espécimes foram corados com hematoxilina-eosina e imagens digitais foram adquiridas a partir do exame histológico de rotina; a luminância em escala de cinza foi analisada utilizando método quantitativo de análise de textura de imagem digital: transformada rápida de Fourier, calculada a partir dos valores do momento de inércia (função harmônica) das frequências espaciais nas direções vertical e horizontal da camada espinhosa da epiderme. Amostras de pele de nove pacientes com SSL também foram obtidas para cultura de fibroblastos utilizando método padrão para dosagem da enzima FALDH. Para a extração de DNA genômico foi coletado sangue total periférico de nove pacientes. Os fragmentos foram amplificados por PCR. Os resultados obtidos foram analisados e comparados com a seqüência normal de DNA. **Resultados:** A mutação encontrada foi a 1108-1G→C no intron 7/exon 8. Os pacientes exibiram diferenças na presença e intensidade dos sinais e sintomas da doença (prurido, retardo mental, espasticidade, fotofobia e alterações da retina). No exame de RM dos pacientes com SSL foi observada desmielinização da substância branca profunda; na espectroscopia, presença de pico anormal de lípidios. O estudo da textura da camada espinhosa da epiderme, sob a Transformada de Fourier, mostrou amplitudes de função harmônica mais largas no grupo com SSL na direção vertical e não na direção horizontal, correspondendo a núcleos e nucléolos maiores e ao espessamento focal da carioteca dos ceratinócitos. **Conclusões:** As manifestações clínicas e histológicas da SLS não são exclusivamente decorrentes da mutação c.1108-1G>C, mas também expressão de outras modificações genéticas e influências ambientais. A mutação descrita pode ser classificada como uma causa comum da doença no Brasil. Os achados de textura podem ser explicados pela maior síntese de

DNA na epiderme na SSL, tendo sido descrita, também, uma produção mais rápida da camada córnea e uma renovação celular 3,5 vezes o normal.

*ABSTRACT*



**Background:** Sjögren-Larsson syndrome (SLS) is an autosomal recessive disorder characterized by ichthyosis, mental retardation, and spasticity. Various mutations in the *ALDH3A2* gene that codes for fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) are responsible for the disease but the genotype-phenotype relationships are undefined. **Objectives:** The purpose of this study was to describe ten individuals with Sjögren-Larsson syndrome from four families representing the first cohort of Brazilian patients defined at the molecular level and investigate whether image analysis of routine H&E skin sections using fast Fourier transformation (FFT) could detect structural alterations in SLS. **Patients and methods:** A 5-mm punch biopsy for histologic analysis was obtained under local anesthesia from each patient. Similar biopsies were obtained from age- and anatomical site-matched from 17 controls. The samples were stained with haematoxylin and eosin and observed under a light microscope. Digital images of routine histologic sections were taken and their gray scale luminance was analyzed by FFT. The inertia values were determined for different ranges of the spatial frequencies in the vertical and horizontal directions. Skin biopsies were also obtained from nine patients with SLS for establishing fibroblast cultures using standard methods to determine FALDH enzyme activity. MR imaging was performed in eight patients. Singel-voxel proton MR spectra were acquired from cerebral white matter in seven patients with SLS and in seven controls. Total genomic DNA was extracted from peripheral blood of nine patients using standard methods. *ALDH3A2* exons and their flanking sequences were amplified by PCR and sequenced. **Results:** All patients were homozygous for a unique c.1108-1G>C splice-site mutation and displayed a profound reduction in fatty aldehyde dehydrogenase enzyme activity. The patients exhibited a moderate-to-severe form of Sjögren-Larsson syndrome with respect to mental retardation, spastic diplegia and ichthyosis. Within this phenotypic context, patients varied, even within a family, in the presence of pruritus, thickness of the epidermal granular layer, retinal glistening white dots and photophobia. Brain MR imaging revealed retardation of myelination. Proton MR spectroscopy of white matter revealed abnormal high-lipid peak. The study of epidermal spinous layer texture by Fast Fourier Transform showed higher amplitudes in the vertical direction in SLS patients, corresponding to greater nuclei and nucleoli, higher number of nucleoli and focal thickening of keratinocytes' carioteca. **Conclusion:** We concluded that the latter clinical features are not strictly determined by the

c.1108-1G>C mutation, but are subject to modification by other genetic/environmental factors. The c.1108-1G>C mutation may be classified as a common cause of Sjögren-Larsson syndrome in Brazil. The textural findings are in keeping with higher DNA synthesis and a 3.5x turn over that were demonstrated in SLS epidermis.

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Síndrome de Sjögren-Larsson

A síndrome de Sjögren-Larsson (SSL, omim 270200), tema deste estudo, é uma ictiose congênita rara, de transmissão autossômica recessiva, caracterizada por ictiose congênita, retardo mental, paraplegia ou tetraplegia espástica, defeitos de fala e convulsões (Sjögren e Larsson, 1957). A doença é conhecida mundialmente e ocorre em muitas etnias, porém sua prevalência é desconhecida. Sabe-se que teve origem no norte da Suécia, país onde ocorre o maior número de casos da doença (Theile et al., 1974; Jagell et al., 1981). Juntamente com a Ictiose ligada ao x, Eritrodermia Ictiosiforme Congênita não Bolhosa, Doença de Refsum, Síndrome de Rud, Síndrome de Dorfman Chanarin e Deficiência Múltipla de Sulfatases formam o conjunto das ictioses decorrentes de anormalidades do metabolismo lipídico da epiderme. Com exceção da Ictiose ligada ao sexo, o retardo mental ocorre em todas as outras (Digiovanna, 2003).

A SSL decorre de um erro inato do metabolismo causado pela deficiência de uma enzima aldeído graxo desidrogenase (FALDH) (Rizzo e Craft, 2000), de localização microssomal que cataliza a oxidação dos aldeídos graxos de cadeia média e longa (Kelson et al., 1997). Esses aldeídos são originários do metabolismo de vários lipídios, incluindo os álcoois graxos (Rizzo et al., 1998), ácido fitânico (Verhoeven et al., 1998), glicerídeos (Rizzo et al., 2000) e leucotrienos B4 (Willemsen et al., 2001b). A deficiência da enzima FALDH foi demonstrada em vários tecidos incluindo cultura de ceratinócitos, fibroblastos, mucosa intestinal (Rizzo et al., 2001). Os sintomas neurocutâneos são decorrentes do acúmulo de álcoois graxos de cadeia longa e de leucotrienos B4 (Willemsen et al., 2001b), e conseqüente diminuição de certos ácidos graxos polinsaturados. Essa anormalidade bioquímica decorre de mutações em um gene no cromossomo 17p11.2, sendo denominado ALDH3A2 (De Laurenzi et al., 1996). Várias mutações foram descritas no gene ALDH3A2, muitas delas restritas a uma família e descritas na Europa e Oriente Médio, sendo relatadas deleções, inserções e substituições de aminoácidos. No que se refere a histopatologia, a microscopia óptica como na maioria das ictioses é característica: encontram-se hiperkeratose ortoceratótica, acantose e papilomatose na epiderme. A camada granulosa pode apresentar-se levemente espessada ou não. Os

vasos subepidérmicos são um pouco dilatados e envoltos por um infiltrado mononuclear (Hofer e Jagell, 1982). Tais achados são inespecíficos e restritos a epiderme.

Este estudo corresponde à primeira análise genético-molecular de uma amostra de pacientes brasileiros com SSL. É de particular interesse a origem dessas mutações e o entendimento desses mecanismos moleculares com o intuito de elucidar mais questões a respeito dos padrões de expressão da FALDH, relacionando os mecanismos patológicos envolvidos (Rogers et al., 1997). Para tal é fundamental a caracterização das alterações de ressonância magnética cerebral e espectroscopia bem como a dosagem da FALDH dos doentes selecionados. Outro interessante neste trabalho foi justamente encontrar características histopatológicas na epiderme da SSL que permitam diferenciá-la das outras formas de ictiose. Para tal foi utilizada um algoritmo matemático chamada Transformada Rápida de Fourier (FFT) já utilizado na dermatologia para a análise morfométrica de elementos da derme (van Zuijlen PPM et al., 2002). Abaixo segue uma breve descrição do método de textura epidérmica utilizado neste estudo.

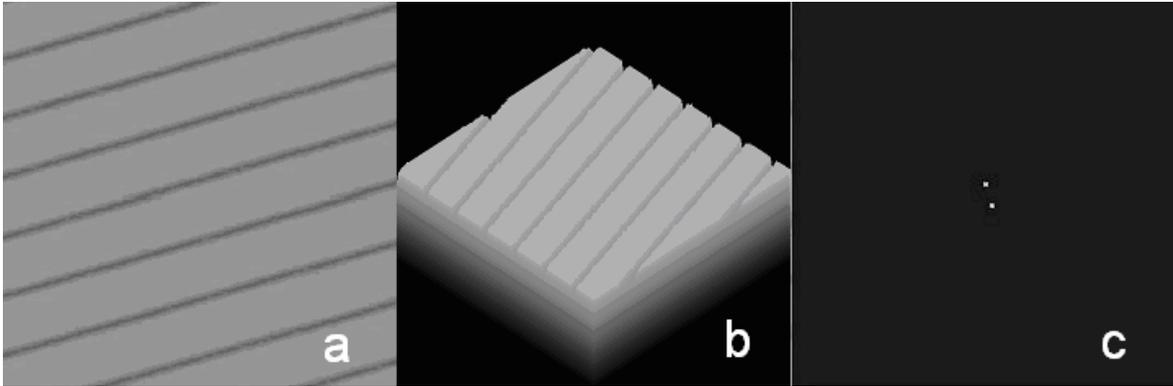
## **1.2-Textura**

Tradicionalmente a análise de textura é feita pela análise de características de morfometria tais como diâmetro, área nuclear e nucleolar (van Zuijlen PPM et al., 2002). Com o surgimento da aquisição da imagem cito ou histológica por computador (imagem digitalizada), muitas abordagens foram desenvolvidas para quantificar a textura em imagens digitais, incluindo estatística simples, estatística markoviana, análise de gradientes, análise granulométrica, transformada de Fourier e análise fractal (Adam, 2002). Estes métodos permitem geralmente a mensuração de parâmetros morfométricos simples, tais como diâmetro, perímetro e área. Estes parâmetros podem ser usados com o intuito de se estimar pequenas mudanças que não são óbvias ao olho humano, ou porque são invisíveis ou porque são difíceis de incluir numa descrição qualitativa.

A textura descreve a aparência genérica de parte de cada imagem, freqüentemente expressa como aparência macia, arenosa, regular, lineada, grosseira, etc... As medidas de textura são propriedades estatísticas locais de uma imagem, e podem ser

calculados a partir da textura de uma imagem armazenada na memória de um computador. A FFT é um algoritmo matemático que transforma dados de imagem em períodos e frequências que são representados na figura padrão-espectro de Fourier. Este método é usado principalmente para análise de imagens bidimensionais como é o caso da imagem histológica (Adam, 2002), e permite calcular orientação, periodicidade e espaçamento de estruturas como as fibras colágenas e vasos sanguíneos, demonstrando ser um método objetivo em dermatopatologia ( Heymans et al., 1999; Rie Ma et al., 2002; Zuyle et al., 2002).

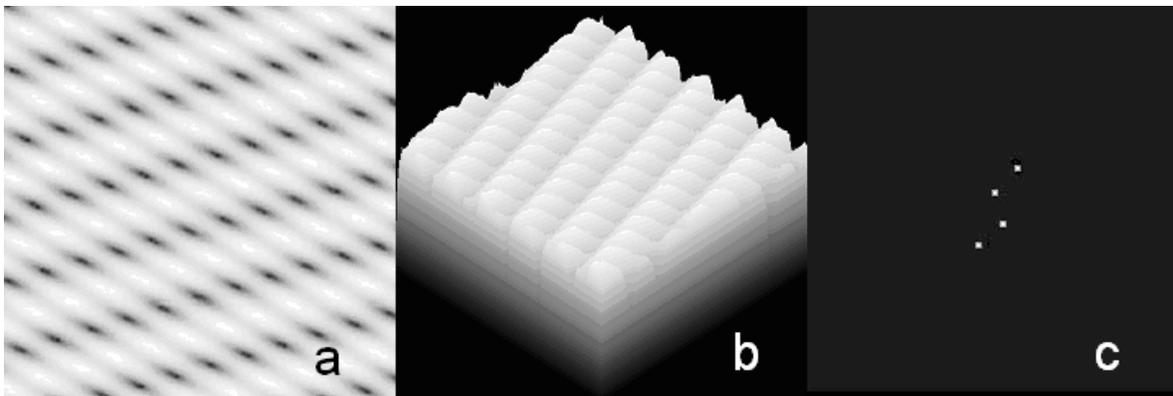
A imagem digital de um núcleo é composta por pixels com graus de cinza formando um padrão. A textura nuclear depende da relação espacial de cada pixel com seus pixels vizinhos, sendo uma propriedade que expressa a distribuição e a inter-relação espacial entre os vários graus de cinza que compõem um objeto. A análise de Fourier transforma imagens do domínio espacial para o domínio de frequência, medindo a repetição de eventos periódicos. Em processamento de imagem, a frequência espacial é a medida que expressa o ritmo das alterações de brilho (ou seja, dos níveis de cinza, geralmente entre 0 a 255) que ocorrem numa seqüência de pontos em uma dada direção na imagem. Altas frequências espaciais correspondem a detalhes de brilho que variam rapidamente. Baixas frequências espaciais representam variações lentas do brilho. A distribuição das frequências representa a periodicidade da imagem e as interferências direcionais. As características de textura de Fourier podem ser calculadas a partir das distribuições das frequências em diferentes regiões do espaço transformado. Utilizando o algoritmo FFT, transforma-se cada onda “oculta” da figura original em um par de elementos pictóricos (pixels) na imagem transformada (FFT), com pontos simétricos ao centro da imagem FFT. Assim, cada par de pixels com pontos simétricos na imagem transformada representa uma onda da imagem original ou traduzindo uma função harmônica da imagem original. O conjunto de todos os pares de pixel da imagem FFT representa a soma das funções harmônicas correspondentes na imagem original. Na Figura 1, composta por apenas uma função harmônica, a imagem FFT mostra somente um par de pixels simétricos, enquanto na Figura 2, composta por duas funções harmônicas com frequências e direções diferentes, há dois pares de pixels. Uma autêntica imagem histológica 3, no entanto, é composta por um grande número de componentes harmônicos (Adam,2002).



**Figura 1**

**Figura 1a, 1b and 1c:**

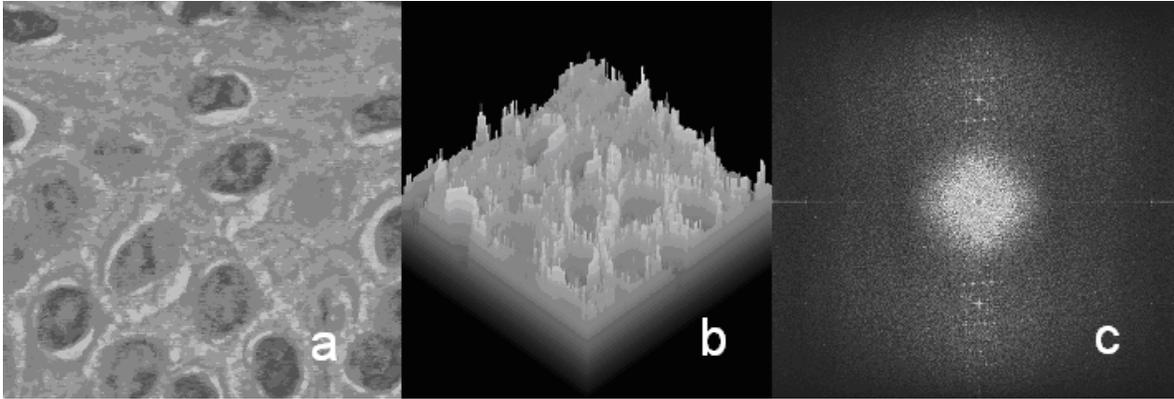
Imagem original com ondas diagonais (a), representação pseudo-tridimensional (b), imagem transformada como espectro de Fourier, um par de pixels representam um onda da imagem original.



**Figura 2**

**Figura 2a, 2b e 2c:**

Imagem original com 2 ondas diagonais (a), representação pseudo tridimensional (b) e como espectro de Fourier (c) dois pares de pixels representam 2 ondas na imagem original.



**Figura 3**

**Figura 3a, 3b e 3c:**

Imagem original de epiderme normal (a), representação pseudotridimensional (b) e a imagem transformada como espectro de Fourier (c), a qual mostra inúmeros pontos brilhantes representando todas as ondas que compõem a imagem original.

## ***2- OBJETIVOS***

## **2.1- Objetivo geral**

Estudar os aspectos clínicos, radiológicos (neuroimagem e espectroscopia), bioquímicos, histopatológicos e moleculares de dez pacientes com a SSL.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Descrever a apresentação clínica dos pacientes com SSL estudados;
- Caracterizar as alterações cerebrais de ressonância magnética e espectroscopia de próton nos pacientes com SSL estudados;
- Desenhar os melhores primers para amplificação dos 10 exons do gene ALDH3A2, padronizar a técnica de PCR para amplificação dos exons do gene ALDH3A2 e descrever as mutações no gene ALDH3A2 responsáveis pela SSL no Brasil;
- Dosar as enzimas (FALDH) em cultura de fibroblastos da pele dos pacientes com SSL estudados;
- Analisar a textura da epiderme dos pacientes com SSL por meio de imagem digital utilizando a FFT.

### ***3- REVISÃO DA LITERATURA***

### 3.1- As ictioses

As dermatoses ictiosiformes formam um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por diferenciação anormal da epiderme (queratinização). A palavra é originária do grego *ichthys* (peixe). Na literatura médica indiana mais antiga datada 200-300 antes de Cristo chamada *Charaku Sumhita* é reconhecida uma entidade “*Ēkakushtha*” dermatose semelhante a escamas de peixe (Menon e Hoberman, 1968)<sup>1</sup>.

O diagnóstico específico de uma ictiose é primordial para o indivíduo e sua família, tanto para prognóstico quanto para aconselhamento genético (Rand et al., 1983); porém, não raro, o diagnóstico permanece incerto, gerando desconforto e dúvidas para a família e para o médico assistente. O heredograma ajuda na determinação do padrão de herança, contudo a falta de uma história familiar não exclui um padrão de herança autossômico dominante já que muitas das ictioses estão associadas a mutações espontâneas (Digiovanna, 2004). O anexo 1 apresenta as características das principais ictioses.

Existem formas hereditárias e adquiridas, variando muito em intensidade e extensão, desde formas leves (xerodermia) até quadros graves incompatíveis com a vida (Feto Arlequin), podendo estar limitada à pele ou atingir outros órgãos. Algumas manifestações clínicas auxiliam determinação da etiologia tais como características das escamas, acometimento de anexos cutâneos, alteração de mucosas, alterações de outros órgãos, somando-se, para um estudo sistemático, aos aspectos histopatológicos e alterações bioquímicas (anexo 1). No que se refere aos mecanismos fisiopatológicos, as ictioses são classificadas em ictioses hiperproliferativas, nas quais observam-se maior produção de ceratina na epiderme, e ictioses por retenção, nas quais ocorre dificuldade de eliminação das células ceratinizadas. Atualmente é consenso na literatura classificar as ictioses de acordo com o conjunto de alterações genéticas, bioquímicas, histopatológicas e clínicas (Digiovanna, 2003).

---

<sup>1</sup> Menon e Hoberman apud Digiovanna JJ, Robinson-Boston L. *Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management*. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4(2):81-95.

O exame histopatológico de rotina em geral não define a ictiose. As anormalidades são restritas ao espessamento da epiderme e do estrato córneo com pouca ou nenhuma alteração da derme, necessitando geralmente de outros métodos mais sofisticados como microscopia eletrônica, dosagens bioquímicas e estudo molecular, para elucidação diagnóstica. Algumas poucas ictioses apresentam histopatologia característica como a ictiose vulgar na qual a hiperqueratose se estende para os folículos pilosos, resultando em grandes rolhas foliculares, além de camada granulosa fina ou ausente (Hernandez-Martinez, 1999) e a hiperqueratose epidermolítica na qual o substrato morfológico é facilmente identificado, pois observa-se vacuolização das camadas granulosa e malpighiana, com grânulos de córneo-hialina dispersos no estrato granuloso vacuolizado (Digiovanna e Bostom, 2003).

### **3.2- Síndrome de Sjögren-Larsson**

#### 3.2.1- Aspectos Históricos e Epidemiologia

A doença foi observada pela primeira vez por Sjögren em 1956, em um estudo clínico e genético que descrevia a oligofrenia associada a ictiose eritrodérmica, além de síndrome espástica com degeneração da retina (Sjögren, 1956). Sjögren e Larsson, um ano depois descreveram 28 indivíduos oriundos do norte da Suécia, muitos eram descendentes de ciganos. Em oito das treze famílias estudadas havia uniões consanguíneas e a distribuição dos afetados sugeria herança autossômica recessiva (De Laurenzi et al., 1997).

A doença tem distribuição mundial sendo descrita em muitas etnias, entretanto prevalência exata é desconhecida (Theile, 1974). A maior parte dos pacientes descritos por Sjögren e Larsson descendiam de um mesmo ancestral que deve ter introduzido o gene da SSL no norte da Suécia há 600 anos. Provavelmente devido a esse efeito fundador a prevalência da SSL na Suécia, especificamente nas províncias de Vasterbotten e Norrbotten seja muito superior em relação a outros países (8,3/100.000); aproximadamente 1,3% da população no norte deste país é heterozigota para o gene da SSL (Heijer et al., 1965; Selmanowitz et al., 1967; Iselius et al., 1989). A prevalência na Suécia toda estima-se ser de 0,4/100.000 habitantes (Jagell et al., 1981).

### 3.2.2- Manifestações Dermatológicas

A ictiose está presente desde o nascimento, caracterizada principalmente pela hiperqueratose e eritema. Ocorre espessamento cutâneo, com descamação furfurácea proeminente em região periumbilical e áreas flexurais (Auada, et al., 2002). Não raro, a criança é diagnosticada como um recém-nato pós-termo pelo médico não especialista. Ictiose coloidiana é descrita em 18% dos casos de SSL (Rizzo, 2001). Já no final do primeiro ano de vida observa-se ictiose generalizada, caracterizada principalmente por hiperqueratose e liquenificação (Lacour, 1996). As flexuras são particularmente comprometidas, porém, nessas áreas, ocorre diminuição da hiperqueratose provavelmente decorrente da melhor umectação das áreas intertriginosas. Os sinais patognomônicos, pode -se assim dizer, são estriações radiadas na região periumbilical e hiperqueratose não descamativa com acentuada liquenificação em todo o tegumento. Com o decorrer dos anos o espessamento cutâneo torna-se mais pronunciado. Nas áreas flexurais, percebe-se pigmentação de cor castanha-cinza a negra, semelhante a acantose nigricante (Branding et al., 2005). No restante do tegumento, a ictiose apresenta tom castanho amarelado. Nos membros superiores e tronco a descamação torna-se mais pronunciada, porém sempre furfurácea. Nos membros inferiores e região lombar, as escamas tornam-se mais grosseiras padrão lamelar. Nas falanges distais a pele é afilada e brilhante. Palmas e plantas são envolvidas com discreta hiperqueratose (Branding et al., 2005). Por razões desconhecidas a região central da face raramente é acometida. Cabelos, unhas e glândulas permanecem inalterados. Clinicamente a distinção com outras formas de ictioses recessivas, principalmente a ictiose lamelar e ictiose eritrodérmica congênita, pode ser difícil até que ocorram as alterações neurológicas (Jagell e Liden, 1982; Lacour, 1996; Rizzo, 2001). Outro sintoma característico e constante é o prurido, facilmente reconhecido já na primeira consulta. É interessante salientar que prurido é descrito nas outras formas de ictiose decorrentes de alterações no metabolismo lipídico, como na ictiose ligada ao X, na doença de Refsum, doença de Conradi (Epstein et al., 1987).

### 3.2.3- Manifestações neurológicas

Os sintomas neurológicos desenvolvem-se no decorrer do primeiro ou segundo ano de vida. A espasticidade é constante, com intensa contratura dos membros, e acentua-se nas primeiras décadas, impedindo o desenvolvimento motor. Os pacientes que inicialmente deambulam, são confinados a cadeira de rodas já no final da terceira década (Taube et al., 1999). Oligofrenia é um dos sinais cardinais já descritos por Sjögren e Larsson em 1957, e está presente em todos os pacientes, embora em graus variados. Não há relação entre o grau de ictiose e o acometimento neurológico (Jagell e Heijbel, 1982); essa correlação existe entre o grau de espasticidade e o retardo mental (Rizzo, 1993; van Domburg et al., 1999). Reflexos osteotendíneos são exaltados e o tônus muscular é aumentado. O quadro clínico característico é de flexão fixa angular à direita dos cotovelos e joelhos, e contratura dos punhos e tornozelos em posição neutra (Lacour, 1996; Haddad et al., 1999). Com o decorrer dos anos ocorre atrofia muscular distal e hipotonia significativa do tronco, e os pacientes necessitam de suporte para a posição sentada (Haddad et al., 1999). Willemsen et al. (1999a) referem a prematuridade na sua série de pacientes aproximadamente em 71% dos casos, porém o comportamento neurológico não deve ser atribuída a prematuridade (Willemsen et al., 2001a). Geralmente os pacientes apresentam disartria pseudobulbar, embora a compreensão da fala não seja proporcionalmente perdida (van Domburg et al, 1999). Outros achados incluem baixa acuidade visual, convulsões em aproximadamente um terço dos pacientes, e baixa estatura decorrente do atraso do desenvolvimento neuromotor. Não são descritas outras alterações de sistema nervoso central, embora possa haver discreto déficit sensorial (Van Domburg et al., 1999). O quadro neurológico completo, incluindo espasticidade, retardo mental e disartria, ajusta-se ao padrão das leucodistrofias (Menkes et al., 1990).

### 3.2.4- Manifestações oftalmológicas

Muitos pacientes exibem depósitos cristalinos retinianos perimaculares, referidos na literatura como *glistening white dots*<sup>2</sup> ou pontos brilhantes de retina. Esse achado é patognomônico. Embora sua prevalência seja variável, os “White dots” são facilmente diferenciados das outras retinopias pigmentadas oriundas de outros erros inatos do metabolismo (Rizzo, 2001). Em seu artigo original, Sjögren e Larsson (1957) referiram que 25% dos pacientes examinados apresentavam alterações de retina. Theile (1974) avaliou 76 pacientes e constatou os “glistening dots” em 20% deles (15 pacientes). Já Jagell e colaboradores, em 1980, relataram alterações retinianas em 100% dos 35 pacientes. É interessante destacar que foram inclusos na casuística de Jagell et al. (1980) cinco pacientes descritos por Sjögren e Larsson (1957) e que na época não apresentavam alterações. Nos pacientes confirmados bioquimicamente por Rizzo et al. (2001) a retinopatia ocorreu em 30% dos casos. Esses “glistening dots” ou pontos brilhantes da retina aparecem já na infância e tendem a aumentar com a idade (Willemsen et al., 2000). O seu número não se correlaciona com a gravidade do acometimento cutâneo ou neurológico. Muitos autores atribuem a prevalência variável à dificuldade do exame clínico dos pacientes, sendo que muitos deles sofrem de fotofobia, fato que dificulta ainda mais o exame oftalmológico (Willemsen et al., 2000). Jagell et al. (1980) e Willemsen et al. (2000) concordaram que na verdade ocorre deposição contínua do pigmento na retina com o decorrer dos anos, pois muitos pacientes examinados na infância não apresentavam anormalidades de fundo de olho, e após seis a dez anos já havia alteração. As consequências funcionais decorrentes do depósito do pigmento retiniano ainda são controversas e difíceis de serem corretamente avaliadas. Alguns autores referem diminuição da acuidade visual e ambliopia, porém há preservação das outras funções retinianas (Willemsen et al., 2001b). Não é possível afirmar se o prejuízo visual é decorrente do depósito retiniano ou da desmielinização do trato óptico (Jagell et al., 1980). Ocorre alta prevalência de miopia e astigmatismo nos pacientes afetados (Theile et al., 1974; Jagell et al., 1980; Willemsen et al., 2000).

---

<sup>2</sup> Inglês

### 3.2.5- Outras manifestações

Outros sinais cardinais da SSL incluem: (1) displasias ósseas múltiplas, principalmente de esfenóide; (2) displasias dentárias, sendo que pacientes com SSL apresentam maior frequência de cáries, gengivites e displasia do esmalte dentário (Bonafé et al., 1987).

A variedade dos sinais clínicos requer atendimento multidisciplinar com a participação das diversas especialidades médicas, incluindo dermatologia, neurologia, oftalmologia, ortopedia e genética, além de terapias de suporte como a fisioterapia (Lacour, 1996).

### 3.2.6- Neuroimagem

Na tomografia computadorizada, não são observados alterações estruturais de tronco cerebral, cerebelo, glânglios da base, corpo caloso e córtex cerebral. A avaliação de imagem deve ser feita por ressonância magnética de crânio e espectroscopia, sendo que as anormalidades aparecem já nos primeiros anos de vida e são similares em todos os pacientes descritos na literatura, variando apenas na intensidade do acometimento. As alterações são restritas à substância branca e ao trato córtico-espinhal, e sugerem acúmulo de lipídios e seus metabólitos. Ocorre principalmente retardo na mielinização da substância branca, com déficit mielínico permanente e gliose periventricular (Mao et al., 1999; Willemsen et al., 2004). Na espectroscopia observa-se pico aumentado de lípidos (Miyamoto et al., 1995). Este dado oferece parâmetro quantitativo para monitorização de intervenções terapêuticas (Willemsen et al., 2004). Os mecanismos fisiopatológicos que causam essas anormalidades permanecem desconhecidos, não ocorrendo proporção direta entre as alterações de ressonância magnética de crânio e espectroscopia e o grau de retardo neuromotor (Willemsen et al., 2004).

### 3.2.7- Histopatologia

As alterações à microscopia óptica na SSL são praticamente restritas à epiderme, impossibilitando diferenciá-la das outras formas de ictiose. Observa-se acantose, papilomatose e hiperkeratose. A camada córnea tem aspecto de cesta de vime e a camada granulosa apresenta-se levemente espessada. Frequentemente, nota-se um discreto infiltrado linfocitário na derme alta. Os anexos cutâneos são preservados (Hofer e Jagel, 1982; Ito et al., 1991). Embora haja autores que estudaram a ictiose na SSL por microscopia eletrônica (Ito et al., 1991; Jagell et al., 1982; Lahmar et al., 1984; Matsuoka et al., 1982) a patogênese da doença não foi esclarecida. Tais autores acima mostraram que no citoplasma dos ceratinócitos das camadas córnea, granulosa e espinhosa havia presença de corpos lamelares gigantes em grande quantidade, tanto na pele normal quanto na pele ictiótica de pacientes com SSL. Esses corpos lamelares, além do seu diâmetro anômalo, apresentavam morfologia variada, sendo esféricos e ovóides (Shibaki et al., 2004). Foram observadas também estruturas anômalas provavelmente derivadas de organelas intracelulares (complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas e cisternas) nas camadas granulosa e espinhosa, e que seriam incompletamente digeridas, na diferenciação terminal da epiderme, permanecendo na camada córnea (Matsuoka et al., 1982). Em seus estudos, Mohrenschlager et al. (2005) constataram no estrato córneo da epiderme de pacientes com SSL a presença de vacúolos lipídicos com restos de membranas de colesterol.

### 3.2.8- Fisiopatologia

Rizzo e colaboradores foram os primeiros a constatarem um defeito na oxidação de álcoois graxos em culturas de fibroblastos de indivíduos afetados pela SSL, devido a deficiência na atividade do complexo enzimático da álcool graxo: nicotinamida dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) oxidoreductase – FAO (Rizzo et al., 1988).

A FAO é um complexo enzimático que consiste de duas proteínas, a FADH (álcool graxo desidrogenase) e a FALDH (aldeído graxo desidrogenase). A FADH oxida álcool graxo para aldeído graxo e a FALDH oxida sequencialmente o aldeído graxo para

ácido graxo. Entretanto, estudos subsequentes em cultura de fibroblastos determinaram que o componente deficiente da FAO nos indivíduos com SSL era a enzima FALDH (Ichihara et al., 1986; Rizzo et al., 1989; koone et al., 1990). A FALDH é uma enzima ainda pouco caracterizada na família das aldeído desidrogenases (ALDHs), as quais catalisam um grande número de importantes reações metabólicas de oxido-redução endógenas e exógenas (Lindahl e Petersen, 1991; Vasiliou e Nebert, 2005). Há pelo menos 10 tipos de isoenzimas aldeído desidrogenases, classificadas em três tipos, de acordo com sua distribuição subcelular e especificidade do substrato. Com relação ao metabolismo de lipídios e localização microssomal, a FALDH está situada na classe 3 das ALDH (Lindahl e Petersen, 1991). No genoma humano foram identificados 19 genes funcionais e três pseudogenes ALDH responsáveis por essa superfamília de enzimas. Mutações no gene ALDH, além de doenças genéticas como a SSL e a hiperlipoproteinemia tipo II, acarretam doenças complexas e multisistêmicas como neoplasias malignas e doença de Alzheimer, uma vez que as ALDHs são fundamentais nos processos de óxido-redução intracelular (Vasiliou e Nebert, 2005).

A significativa variação da FALDH contrasta com a clínica relativamente restrita associada à doença. Os defeitos cutâneos e a desmielinização no cérebro estão de acordo com a FALDH nesses tecidos. Por outro lado, não há evidências de comprometimento no fígado, pulmões e músculos esqueléticos, apesar da alta expressão da enzima nesses órgãos e tecidos. Não se sabe como o defeito enzimático determina as alterações teciduais. Estudos confirmaram o acúmulo de álcoois graxos de cadeia longa (hexadecanol e octadecanol) no plasma e a conseqüente diminuição de certos ácidos graxos poliinsaturados. Acredita-se que este defeito metabólico no ciclo bioquímico dos álcoois graxos descrito por Rizzo, seja específico da SSL e responsável pelas alterações cutâneas e neurológicas (Rizzo et al, 1988).

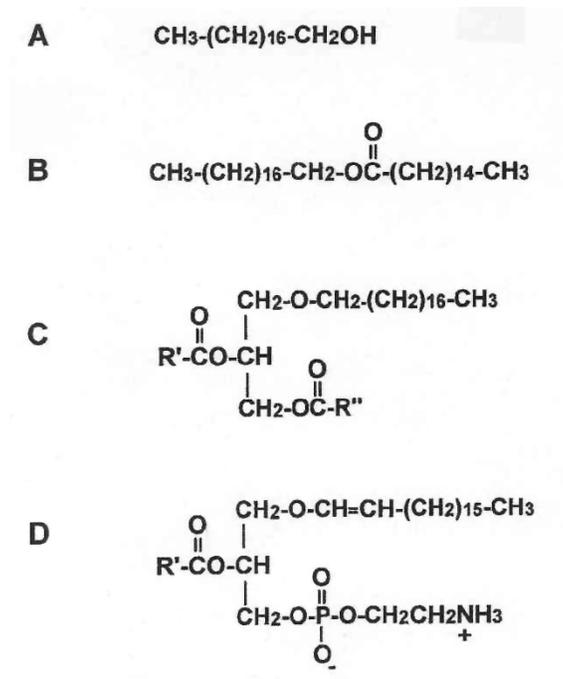
#### 3.2.8.1- Álcool graxo

A presença de álcoois graxos de cadeia longa no metabolismo é conhecida há muitos anos, porém poucos estudos têm se concentrado nesta área em comparação aos estudos de outros lipídios, como ácidos graxos, esteróis e fosfolipídios. De fato, pouco se

conhece sobre a função ou mesmo as funções biológicas dos álcoois no organismo. Nos últimos anos, foram descobertas algumas doenças genéticas relacionadas a defeitos no metabolismo dos álcoois graxos, aumentando o interesse para essa classe de lipídios pouco explorada até então (Rizzo, 1998).

Os álcoois graxos existem na forma livre ou como componentes de outros lipídios como as ceras. Nos mamíferos, a maior parte dos álcoois graxos livres é saturada e monoinsaturada, com cadeias de 16 a 20 carbonos. As ceras são compostos de álcoois graxos de cadeia longa (16 a 20 carbonos) esterificados a ácidos graxos (a partir de 14 até 36 ou mais átomos de carbono) e tipicamente mostram uma cadeia similar de álcool e ácido graxo em sua extensão (RIZZO, 1998). Fazem parte também dos álcoois graxos os plasmalogênios e os éter-lipídios (glicerolipídios).

Já os éter-lipídios possuem estrutura diversificada. Na maior parte, o éter ligado ao álcool é incorporado na posição 1 do glicerol e na posição 2 é esterificado com ácido graxo. A posição 3 pode ser esterificada com ácido graxo (alquildiacilglicerol), chamado éter-lipídio neutro, ou ocupada por um fosfatidiléster com etanolamina, colina ou serina: estes são os glicerolipídios, um subgrupo dos fosfolipídios. Quando a cadeia 1-o-álquil é insaturado na posição 1,2, o fosfolipídio resultante é chamado plasmalogênio.



**Figura 4** - Estrutura química dos álcoois graxos e seus derivados.

A- Octadecanol-álcool graxo livre

B- Cera- Palmitato de octadecanol

C- Glicerolipídios-alkildacilglicerol

D- Plasmalogênio

Dentro da cadeia alimentar, os álcoois graxos, como componentes das ceras, compreendem a maior reserva de energia para os animais marinhos. As ceras são proeminentes nos microorganismos marinhos, servindo como fonte de energia dietética para os peixes. Nos tubarões e em certos peixes os éter lipídios neutros (alquil-diacilglicerol) e as ceras, ambos sintetizados a partir dos álcoois graxos, perfazem a maior reserva de lipídios do fígado e de outros tecidos (Rizzo et al., 2001 a). Os álcoois graxos são ativamente sintetizados por plantas e incorporados na membrana celular das folhas, funcionando como importante barreira contra a perda de água. A aparência brilhante das folhas de muitas plantas tropicais, azevinhos, rododendros e mesmos das trepadeiras é um reflexo das suas camadas de ceras. Desta maneira os herbívoros dependem, até certo ponto, em grande parte do valor nutritivo dos álcoois graxos (Hanahan, 1986).

Nos mamíferos, os álcoois graxos livres representam uma pequena porção da composição lipídica na maioria dos tecidos, correspondendo a menos de 0,01 do total da massa de lipídios. Comparativamente, são mais abundantes quando incorporados às ceras e aos glicerolipídios. São particularmente proeminentes em certos tecidos como pele, cérebro, nervos periféricos, medula óssea, eritrócitos e coração. Na pele, particularmente as ceras e os glicerolipídios estão presentes na secreção sebácea, respondendo por 24% e 15% respectivamente do total dos lipídios da superfície cutânea (Kubo et al., 1995). Nos vertebrados, as ceras são secretadas pelas glândulas sebáceas como uma capa protetora para manter a pele flexível lubrificada e à “prova d’água”. O cabelo, a lã e o pêlo dos animais são também cobertos por secreções serosas. Os pássaros, principalmente os aquáticos, secretam ceras por meio da glândula chamada uropígeo para tornar suas penas impermeáveis à água. Na mielina presente no cérebro humano quase a totalidade da fosfatidiletanolamina está na forma de éter plasmalogênio, perfazendo 11% a 14% do total de lipídios (Rizzo, 1998).

Com algumas exceções, o papel biológico dos álcoois graxos e dos seus derivados lipídicos não é conhecido. O fator ativador de plaquetas é um éter lipídio (1-alquil-2-acetil-glicero-3-fosfocolina), sendo um mediador químico com papel importante na coagulação sanguínea (Hanahan et al., 1986). Há estudos “in vitro” com células deficientes em plasmalogênios demonstrando evidências que os glicerolipídios podem

servir como membranas biológicas de proteção contra a radiação ultravioleta (Zoeller et al., 1988). Estes mesmos éter lipídios podem servir como membrana de fusão durante a exocitose e endocitose (Lohner et al., 1996). Álcoois graxos de cadeia curta com menos de 14 carbonos apresentam propriedades anestésicas que se perdem com o aumento da cadeia carbônica (Pringle et al., 1981). Álcoois graxos, ceras, glicerídios e outros lipídios presentes na epiderme contribuem para a barreira de água da pele e a presença desses lipídios na secreção sebácea humana confere proteção contra microrganismos, inclusive vírus (Snipes et al., 1977; Sands et al., 1979; Kubo et al., 1995). O hexadecanol *in vitro* é um inibidor da atividade da lipase, mas *in vivo* não foi demonstrado efeito similar (Ferreira et al., 1990).

Nos mamíferos, os álcoois graxos são derivados da dieta e sintetizados endogenamente a partir dos ácidos graxos. Os vegetais são uma importante fonte alimentar de álcoois graxos, porém o mecanismo da digestão dos álcoois graxos livres ou das ceras pelo homem não está esclarecido. O consumo dietético dos álcoois graxos de cadeia longa e, conseqüentemente, a sua contribuição para o “pool” total dos álcoois no homem, não está definida. Uma exceção é o fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol), um álcool graxo de cadeia longa (20 carbonos) derivado dos vegetais e que não é sintetizado pelos mamíferos. O fitol origina-se em parte das plantas e da quebra da clorofila, principalmente no intestino nos ruminantes. O homem absorve o fitol através da dieta e o transforma em ácido fitânico (Rizzo, 1998; Rizzo et al., 2000); a FALDH está envolvida na conversão do fitol para ácido fitânico (Van Den Brink et al., 2005). A síntese e a degradação dos álcoois graxos são dependentes da velocidade de síntese das ceras e dos éter lipídios, os quais tem as suas concentrações diferentes nos diversos tecidos. Enzimas envolvidas no metabolismo do álcool graxo têm sua ação coordenada pela biodisponibilidade e necessidade de síntese de álcool graxo (Rizzo, 1998). Não se sabe se o ciclo do álcool graxo tem outra função além de gerar precursores para biossíntese de lipídios ou na reciclagem dos mesmos. Nas células que têm baixa taxa de síntese de éter lipídios e ceras, a via metabólica do álcool graxo parece não ter muita utilidade, porém a troca dos equivalentes redutores pode ser importante para outras reações de oxidação e redução dentro da célula.

### 3.2.9- Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico da SSL pode ser feito pela medida da atividade da FALDH em cultura de fibroblastos. Nesse caso, os pacientes têm uma profunda deficiência da atividade enzimática da FALDH ou mesmo da FAO. Antigamente, o diagnóstico pré-natal era feito através da biopsia fetal no final do segundo trimestre. Entretanto, esta técnica representava riscos substanciais, incluindo perda fetal, trabalho de parto prematuro e resultado com tempo gestacional muito alto. A dosagem enzimática da FALDH e FAO tornou o diagnóstico menos invasivo, podendo ser feito em líquido amniótico e vilosidades coriônicas (TABSH *et al.*, 1993; RIZZO *et al.*, 1994). Van De Brink *et al.* (2005) propuseram um método alternativo de diagnóstico pré-natal de SSL baseado na deficiência de ácido fitânico em cultura de fibroblastos, uma vez que pacientes com SSL possuem baixa concentração de ácido fitânico nas suas células. Atualmente, a detecção de mutações no gene ALDH3A2 em casais de risco torna o diagnóstico pré-natal de SSL mais preciso e rápido, considerando técnicas como a reação em cadeia da polimerase e análises de restrição na detecção das mutações envolvidas. As dosagens bioquímicas da FALDH e/ou FAO ainda não são disponíveis no Brasil.

### 3.2.10- O Gene da FALDH

A FALDH é largamente expressa em diferentes tecidos, sendo evidente a sua expressão em fígado, rins e intestino. Contrariamente, baixas concentrações são vistas no cérebro e na pele. Permanece incerta a questão sobre a heterogeneidade clínica da doença.

Estudos genéticos evidenciaram que o gene ALDH3A2 surgiu inicialmente no norte da Suécia durante o século XIII ou foi trazido para esta área restrita durante a colonização por pessoas oriundas do sul do país durante o século XIV. Especula-se que esse gene se espalhou pelo norte da Europa durante eventos migratórios da população de Vikings ocorridos anteriormente a este período, especificamente durante os séculos IX e X. Os vikings estabeleceram-se nas regiões do norte da Europa, onde atualmente estão a Alemanha, Holanda e Bélgica (De Laurenzi *et al.*, 1997). Na população da Suécia foi

conseguido determinar um efeito fundador devido a uma mutação comum, neste caso c.943C>T.

O gene que codifica a FALDH foi identificado em 1994. Inicialmente, foi chamado ALDH10. Posteriormente, foi renomeado para ALDH3A2, devido à alta homologia com as outras ALDHs humanas, particularmente a ALDH3 e a ALDH7 do estômago (Miyachi *et al.*, 1991; Hempel *et al.*, 1993; De Laurenzi *et al.*, 1996; Rizzo *et al.*, 2001). O gene foi mapeado no cromossomo 17, na região p11.2 (Pigg *et al.*, 1999) no homem, e no cromossomo 11 no rato, utilizando principalmente os marcadores D17S83 e D17S805 (Rogers *et al.*, 1997; Lacour *et al.*, 1996). A organização genômica é mostrada na figura 5. O gene humano e o de rato têm de 10 exons e 9 introns distribuídos em uma extensão de 30,5 kb no homem, sendo que no rato o gene é um pouco menor, devido à diminuição do tamanho dos introns (25 Kb); as ligações intron-exon são idênticas nas duas espécies (Rizzo *et al.*, 1999; Rizzo *et al.*, 2001b). A enzima FALDH, de localização microssomal, foi inicialmente purificada do fígado e clivada com brometo de cianogênio em dois peptídeos, e então seqüenciada. Através da seqüência de aminoácidos obtida, um fragmento de cDNA de 224 pb foi isolado em rato e usado como sonda para rastrear um banco de cDNA de queratinócito humano. Um clone de 1,8 kb foi isolado e apresentou uma cadeia aberta de aminoácidos de 1.455 pb, codificando uma proteína majoritária de 485 aminoácidos (homem) e 484 (rato) (De Laurenzi *et al.*, 1996).

Tanto no homem como no rato observa-se um *splicing* alternativo do gene resultando em uma transcrição menor, cerca de 10% ou menos do total de proteínas transcritas, que inclui uma seqüência adicional (insere um exon extra entre os exons 9 e 10). O exon extra (exon 9') possui um códon de parada ou determinação, o que resulta na não transcrição do exon 10. A proteína resultante é chamada FALDHv, de maior peso molecular, de 508 aminoácidos, com uma seqüência carboxi-terminal com 26 e 27 aminoácidos no rato e no homem, respectivamente, diferente da enzima majoritária e com função ainda desconhecida. Sabe-se que a porção carboxi-terminal da proteína inicial de 458 aminoácidos é necessária para a ancoragem na membrana microssomal (Rizzo *et al.*, 2001b)). O significado dessas observações e do *splicing* alternativo ainda precisam ser elucidados (Rogers *et al.*, 1997), mas especula-se que a FALDHv deve ter um

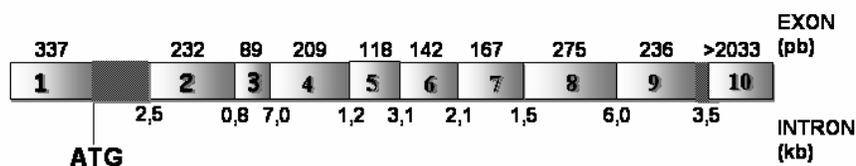
outro meio de interação de membrana ou ligar-se diretamente ao receptor intracelular (peroxissomas) (Rizzo et al., 2001b). O início da transcrição está situado a 258 pb do codon de iniciação ATG. O gene possui também múltiplos sinais de poliadenilação, expressando 3 diferentes transcritos de 2, 3,8 e 4 kb. O significado funcional dos três transcritos ainda não é conhecido. O que se sabe é que no fígado ocorre equivalência das cadeias. Já no cérebro, músculos, coração e pâncreas predomina a cadeia longa (Rogers et al., 1997).

Para confirmar se a deficiência da FALDH era mesmo responsável pela síndrome de Sjögren-Larsson, inicialmente três pacientes foram estudados com relação à seqüência do gene isolado ALDH3A2. A extensão dos estudos do gene ALDH3A2 pode elucidar mais questões a respeito dos padrões de expressão da FALDH, relacionando os mecanismos patológicos envolvidos. Variações na seqüência da 3'UTR, por exemplo, poderiam resultar em diferentes mutações no gene FALDH e, portanto, levar a diferentes expressões clínicas, por alterar a tradução ou mesmo induzir um splicing alternativo (Rogers et al., 1997).

Mutações no gene da FALDH foram inicialmente relatadas em 1996 (de Laurenzi et al., 1996). Desde então, 72 mutações foram identificadas na SSL (Rizzo e Carney, 2005), sendo que existem 20 diferentes mecanismos patogênicos, sendo sete pequenas deleções, uma deleção grosseira, três com inserção, uma com deleção/inserção e oito com mutação missense (AOKI et al., 2000). As mutações tipo missense são as mais comuns (38%) e são responsáveis por uma diminuição profunda da FALDH (Vasiliou e Nebert, 2005). Mutações foram encontradas em pacientes do mundo todo, com maior freqüência na Europa, Estados Unidos e Oriente Médio. As mutações descritas são únicas de cada família com SSL, mas muitas são comuns entre pacientes europeus e do oriente médio, o que provavelmente reflete um efeito fundador ou eventos mutacionais recorrentes (Vasilioi e Nebert, 2005). Um fator limitante no estudo da heterogeneidade das mutações é a quantidade pequena de trabalhos com descrições clínicas dos pacientes na literatura, dificultando uma estreita correlação genótipo-fenótipo.

## SÍNDROME DE SJÖGREN-LARSSON

### Gene da FALDH-ALDH3A2



- Fígado, intestino, rim
- 17 p11.2
- ALDH10-ALDH3A2

**Figura 5-** Organização do gene humano da FALDH (ALDH3A2) localizado em 17p11.2.

#### 3.2.11- Terapêutica

Alguns estudos tentaram elaborar terapêuticas para a doença baseadas no defeito bioquímico principal, bloqueando, pela da dieta, o aporte exógeno dos ácidos graxos de cadeia longa (Maaswinkel et al., 1994; Taube et al, 1999; Auada et al, 2002). Desde a década de 60, já se especulava sobre algum tipo de defeito no metabolismo dos lipídios na SSL, principalmente em relação à deficiência de ácidos graxos poliinsaturados, produtos da dessaturação delta 6 do ácido linoléico, como a causa das alterações cutâneas. Salienta-se que a deficiência essencial de ácidos graxos também causa descamação da pele. Basicamente, a dieta proposta baseava-se na suplementação dos ácidos graxos essenciais e gorduras poliinsaturadas e na redução das gorduras saturadas com a utilização de uma fonte de triglicerídeos de cadeia média para o preparo dos alimentos. Auada et al. (2002) implementaram a dieta no paciente com SSL de mais tenra idade. Para evitar o aporte exógeno de ácidos graxos saturados com mais de 14 carbonos e de ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa, porquê ambos poderiam levar ao acúmulo de álcool graxo de cadeia longa e seus derivados octadecanol e hexadecanol prejudiciais para os pacientes, optou-se pela substituição do óleo utilizado para o preparo dos alimentos pelo uso da gordura de côco. Esta, por sua vez, é rica em ácido láurico que, segundo Esteves (1980), dentre os óleos e gorduras naturais, o ácido láurico é a fonte mais viável de ácidos

graxos de cadeia média presente na natureza. Como um terceiro passo na dieta, para aumentar o total de gorduras polinsaturadas e diminuir as gorduras saturadas, foi orientado o uso de leite desnatado apenas, evitando-se o uso dos derivados do leite, como requeijão e outros cremes. Para corrigir a deficiência de ácidos graxos essenciais foi fornecido aos pacientes 10ml de óleo de girassol diariamente e orientada a aplicação desse mesmo óleo sobre o tegumento cutâneo uma vez ao dia. Infelizmente, muitas dessas pesquisas obtiveram apenas sucesso parcial. Alguns autores justificam os resultados não satisfatórios pela heterogeneidade genética da síndrome, e, principalmente, pelas várias e diferentes vias endógenas de produção de álcool graxo de cadeia longa.

Recentemente, Willemsen et al. (2001b) descreveram a ação da FALDH no metabolismo dos leucotrienos B4 (LTB4). Eles sugeriram concentrações elevadas dos metabólitos dos LTB4 contribuindo para a patogênese da SSL. A análise urinária dos produtos de degradação dos LTB4 ofereceria um novo método diagnóstico da SSL. Os mesmos autores publicaram um estudo em que tratam um paciente com SSL com um inibidor da 5-lipoxigenase, o Zileuton®, que é um medicamento usado no tratamento da asma. Eles conseguiram alguns benefícios, como a diminuição do prurido. Contudo, o papel dos LTB4 na SSL ainda não está estabelecido, como também não foi definido o tratamento de pacientes com SSL com inibidores de LTB4 (Willemsen et al, 2001a; Willemsen et al, 2001b).

Com o impulso atual da terapia genética, Haug e Braun-Falco (2005) introduziram uma enzima FALDH funcional nos queratinócitos deficitários da mesma, usando DNA recombinante viral. O resultado foi o aumento da transcrição da FALDH nestes queratinócitos, resultando em menor dosagem de aldeídos graxos de cadeia longa no citoplasma, restaurando a atividade da enzima. Outro modelo terapêutico proposto é a reposição enzimática da maneira que é feita na Doença de Fabry (Haug e Braun-Falco, 2005).

Os tratamentos tópicos com emolientes e queratolíticos e o tratamento por via sistêmica com retinóides seguem as mesmas orientações das demais ictioses (Sampaio e Rivitti, 2001). Os doentes devem se proteger do frio e do calor excessivo. Os banhos devem ser rápidos e mornos e com pouco sabonete. Tópicamente são utilizados produtos

que visam restaurar o teor hídrico da pele, como os cremes com uréia e ácido láctico. O ácido salicílico em vaselina é útil devido ao seu poder ceratolítico. Sistemicamente, os retinóides, em especial o etretinato e, mais recentemente, o acitretin, podem beneficiar os doentes nas formas graves de ictiose. Os retinóides resultaram da busca de compostos com atividade semelhante à vitamina A (retinol) nos tecidos epiteliais. Atualmente, utilizam-se, por via sistêmica, os ácidos 13-cis retinóico (isotretinoína) e o trimetilmetoxifenil, que é um análogo da etilamida do ácido retinóico (etretinato). O acitretin, derivado carboxílico do etretinato e com ações idênticas ao mesmo, praticamente o substituiu pela vantagem de ter vida média menor. O acompanhamento deve ser mantido por 2 anos após a interrupção do uso, porque em alguns casos há formação de etretinato a partir do acitretin. Os retinóides diminuem o conteúdo total de ceratina dos ceratinócitos e modificam o padrão de expressão destas ceratinas, podendo, inclusive, induzir o aparecimento de ceratinas fetais (K19, K13), normalmente ausentes na epiderme humana adulta. Os efeitos colaterais são teratogenicidade, alterações tegumentares de sequidão e fragilidade da pele, fotossensibilidade, eflúvio telógeno, alterações ósseas, alterações hepáticas, alterações do sistema nervoso central, musculares e metabólicas. No caso das ictioses, a terapêutica deverá ser mantida por toda a vida, e os efeitos colaterais, particularmente aqueles relativos aos ossos, devem ser controlados e relação risco/benefício analisada. As doses necessárias variam de 0,5 a 2,0 mg/kg/dia. As respostas surgem após 2 meses de tratamento e, a seguir, busca-se a menor dose possível de manutenção (Sampaio e Riviti, 2001).

## *4- MÉTODOS*

#### **4.1- Aspectos éticos**

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (anexo 2) - parecer do projeto 313/2005, CAAE: 0113.146.000-05.

#### **4.2- Casuística**

Foram incluídos dez pacientes, sendo quatro do sexo masculino e seis do sexo femininos, pertencentes a quatro famílias não relacionadas. Nove são acompanhados no Ambulatório de Genodermatoses da Disciplina de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Unicamp, e um é proveniente do Departamento de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. A primeira família é composta de duas irmãs de oito e seis anos e um menino de quatro anos, filhos de pais consangüíneos. A segunda família é composta de três irmãs com 25, 14 e dez anos de idade, respectivamente, filhas de pais não consangüíneos e seus dois primos (mulher de 30 anos e um homem de 28 anos), filhos de pais não consangüíneos; esta família, particularmente, vive em uma pequena comunidade isolada no interior de São Paulo, onde provavelmente deve haver uma maior prevalência de consangüinidade. A terceira família é composta de um indivíduo, de 21 anos, o terceiro filho afetado de um casal de primos em primeiro grau. Os outros dois irmãos morreram de pneumonia na infância. A última família é composta de um paciente masculino, de quatro anos, filho de pais consangüíneos, nascido no estado de São Paulo. Os pacientes são originários dos estados do Paraná (família 1), de São Paulo (família 2 e 4) e Rio de Janeiro (família 3). Para a casuística do estudo molecular participaram os pacientes de #1 a #9, para o histológico de imagem foi retirado o paciente de #9 e introduzido o paciente #10.

#### **4.3- Estudo clínico**

A diagnose de SSL, inicialmente, estabeleceu-se pelos consagrados na literatura, ou seja, ictiose congênita, pruriginosa, com pele de tom acastanhado, acompanhando sinais neurológicos de retardo mental e espasticidade. Também foram

valorizados consanguinidade dos pais. Todos os pacientes com diagnóstico clínico de SSL foram submetidos a avaliação dermatológica, exame oftalmológico completo e avaliações neurológica e genética. Na classificação clínica, foi considerada como ictiose leve a que apresentava apenas xerodermia com escamas finas, moderada a que apresentava xerodermia, descamação furfurácea e liquenificação, e grave a que apresentava xerodermia, descamação, liquenificação e escamas de padrão lamelar.

#### **4.4- Estudo de neuroimagem**

Dentre os dez pacientes com SSL, oito foram submetidos a exame de ressonância magnética de crânio, sendo que em sete foi realizada espectroscopia de hidrogênio por Ressonância Magnética (ERM 1H). As imagens e a ERM 1H foram obtidas em aparelho ELSCINT Prestige, em Campo magnético de 2T, com aquisições nos planos axial, sagital e coronal. Os parâmetros para as diferentes aquisições de imagens foram:

- Imagens sagitais em T1 spin echo, com espessura de 6mm, ângulo de inclinação de 180°, TR (tempo de relaxação, em ms)/TE (tempo de eco, em ms)=550/10, matriz 22x350 e FOV de 25x25cm, utilizadas para orientar o plano de aquisição das demais imagens.
- Imagens axiais pesadas em T1 spin echo (TR/TE=540/12), T2 duplo echo, spin echo (TR/TE=4800/128-16), Flair TR/T1 (tempo de inversão, em ms)/TE=10099/2550/90, ângulo de inclinação zero nos ouvidos internos.
- Não foi administrado contraste paramagnético nos exames realizados.

A aquisição da espectroscopia foi realizada com voxel único, em área de 2x2x2 cm, locado na região parietal dos pacientes 1,3,4,7; na região frontal dos pacientes 2 e 6 e na região de coroa radiada do paciente 5; áreas onde a alteração do sinal era mais evidente. Não foi realizada espectroscopia nos pacientes 8 e 9. Utilizou-se seqüência PRESS, com TE=135ms e TR=1500 ms, em seqüência realizada sem orientação inclinada. A análise levou em conta os sinais dos metabólitos, N-acetil aspartato (NAA), colina (Col), creatina (Cre), e lipídeos. Foi realizada espectroscopia em sete voluntários normais, que constituíram nosso grupo controle com idade e sexo pareado com nossos pacientes.

#### **4.5- Estudo do DNA genômico**

Foram coletados 5,0 ml de sangue total em tubos Vacuntainer com EDTA a 10% como anticoagulante, de todos os indivíduos afetados, e enviados para o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp para extração do DNA e posterior estudo molecular.

Extração de DNA genômico de sangue periférico.

O DNA foi extraído usando-se o protocolo padronizado no Laboratório de Genética Humana - CBMEG.

##### 4.5.1- Amplificação dos exons

Os primers utilizados na amplificação foram desenhados com o auxílio do programa Gene Runner versão 3.00, levando-se em conta as temperaturas de anelamento dos primers direto e inverso, porcentagem de GC (guanina e citosina) menor ou igual a 50%, e tomando-se cuidado com a formação de loops ou dímeros entre eles. A tabela 1 apresenta a seqüência destes primers.

##### 4.5.2- Sequenciamento automático

###### 4.5.2.1- Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 2% usando-se o marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) para posterior seqüenciamento.

#### 4.5.2.2- Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR

As reações de seqüenciamento foram corridas no seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer) utilizando-se o BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (ABI PRISM/PE Biosystems). As reações de seqüenciamento constituíram-se de:

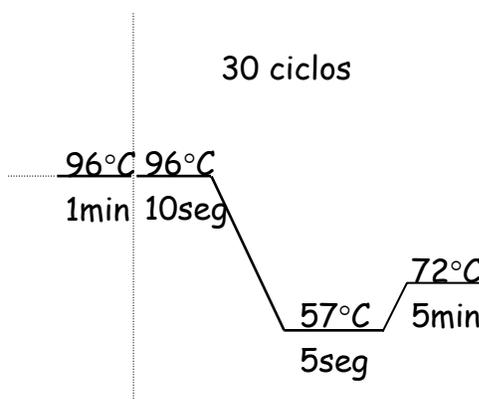
40-80ng de DNA

3 µl do mix BigDye

1µl do primer direto ou reverso (5mM/µl)

H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10 µl.

As condições de amplificação utilizadas estão esquematizadas abaixo na Figura 6.



**Figura 6-** Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento automático.

Adicionaram-se 80ml de isopropanol 75 % e incubou-se por 15 minutos. Centrifugou-se por 30 minutos a 13000 rpm, descartando-se o sobrenadante vagarosamente em papel absorvente. Adicionaram-se 150ml de etanol 70% e centrifugou-se por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e deixando o etanol evaporar por completo. As reações foram mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento. Antes da corrida o pellet foi eluído em 3µl de tampão formamida/Blue Dextran (5:2). A composição do gel de seqüenciamento encontra-se descrita abaixo, e posteriormente foi filtrado em filtro 0,22µm (Millipore).

Gel de acrilamida 4,5%:

360g de uréia

100ml de solução de acrilamida (19:1)

100ml de TBE 10X

10g de resina (Dowex MR-3 [I-9005])

H<sub>2</sub>O para completar 1 litro.

#### 4.5.3- Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio dos programas Chromas e Generuner.

Análise das sequências obtidas:

Pela técnica de seqüenciamento automático foi encontrada a alteração 1108-1G→C no intron 7/exon 8. Esta alteração aboliu um sítio de restrição para a enzima Dde I (Promega). O produto de amplificação do exon 8 apresentou 275bp e na presença da base G o fragmento foi digerido apresentando bandas de 181, 82 e 12bp. Entretanto, na presença da base C o produto da PCR foi digerido em dois fragmentos de 263 e 12pb. O

resultado da análise de restrição foi verificado em gel de agarose (Gibco) na concentração de 2%. A digestão foi feita à 37°C por duas horas como descrito a seguir:

2,0µl de PCR

1,0µl de enzima Dde I (10U/µl)

1,0µl de tampão (buffer React 3 10X)

6,0µl de H<sub>2</sub>O.

**Tabela 1-** Seqüência de *primers* para amplificação dos 10 exons do gene ALDH3A2

| Exon | Seqüência do <i>primer</i> (5'→3') | Fragmento (pb) | Temperatura de anelamento. (°C) |
|------|------------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 1    | SLSD – GTGCAGTTCTCTGCATGGAG        | 175            | 60                              |
|      | SLSR – GTGGGTACCTTGCACAGGTC        |                |                                 |
| 2    | SLSD – CAGAGTGAATTCAATAATGTGTAC    | 253            | 60                              |
|      | SLSR – CATAAGGTGGCACCAGAC          |                |                                 |
| 3    | SLSD – GAAATGCTGTGATTATAAAGCC      | 101            | 50                              |
|      | SLSR – GTCAAGAAATCTTACCTGGTC       |                |                                 |
| 4    | SLSD – GATCTCTATATTGTTATTAATG      | 226            | 50                              |
|      | SLSR – CAGAGAGCCAGACTCAC           |                |                                 |
| 5    | SLSD – CTCAGACGCATAACCTGG          | 123            | 50                              |
|      | SLSR – CTAATTCCTTTGTCACTTC         |                |                                 |
| 6    | SLSD – GTTTTAAATAGGAATTTTATG       | 168            | 50                              |
|      | SLSR – GTATCCATTACCTTTAAGAG        |                |                                 |
| 7    | SLSD – GCCCCAACAGTACTTAC           | 185            | 56                              |
|      | SLSR – GTTCTCTCTAAAGCTTACC         |                |                                 |
| 8    | SLSD – TTGACACATAACTGAGCACACAGCCCT | 275            | 50                              |
|      | SLSR – AGCAGCCCATAACAATCCACTCATG   |                |                                 |
| 9    | SLSD – CCTTTATTTTCAGGTTCCAG        | 263            | 56                              |
|      | SLSR – GTTATAGGGACTCACCTTG         |                |                                 |
| 10   | SLSD – CCAGCTGAGTAAACTGAATC        | 237            | 56                              |
|      | SLSR – GTTGGGACGTAGTTGAAATG        |                |                                 |

#### 4.6- Análise da textura epidérmica

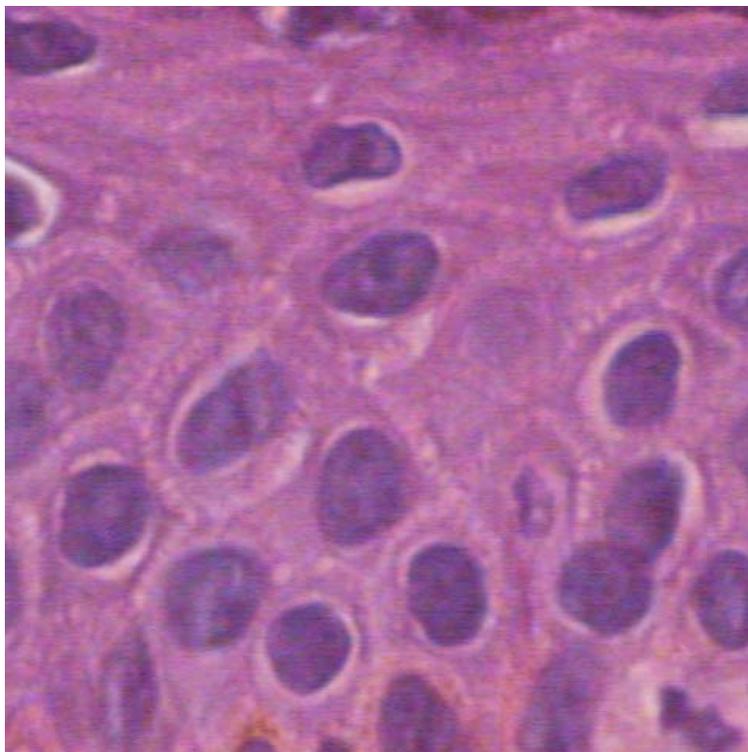
Todos os pacientes selecionados foram encaminhados para biópsia de pele com punch de 5mm sob anestesia local com lidocaína a 2% com vasoconstrictor. Amostras de pele normal (controle) foram retiradas de 17 pacientes voluntários, obtidos da periferia de fragmentos fusiformes de pele, produtos de exérese peri-lesional de nevos melanocíticos ou cistos durante cirurgias dermatológicas de rotina. Os espécimes foram preparados e corados com hematoxilina-eosina, preparados e rotulados de forma aleatória.

##### 4.6.1- Aquisição de imagens

De cada amostra de pele foram adquiridas 10 imagens randomizadas (aleatórias) horizontais da camada espinhosa da epiderme, utilizando-se o sistema KS-300 da Kontron Zeiss (0,1µm/pixel; 1,25 abertura numérica) e um microscópio Axioshop com objetiva de imersão (100x). As imagens coloridas, de 24 bits/*pixel*, medindo 480x480 *pixels*, com 4 *pixels* por micrômetro, foram salvas em CDs, utilizando-se um programa de aquisição de imagens, em formato bitmap (BMP), sem compressão. Somente a camada espinhosa foi fotografada no melhor foco, ou seja, onde os contornos nucleares dos ceratinócitos eram mais nítidos (figura 7). As imagens foram feitas por apenas um examinador (MPAS).

##### 4.6.2- Pré-processamento das imagens (transformada de Fourier)

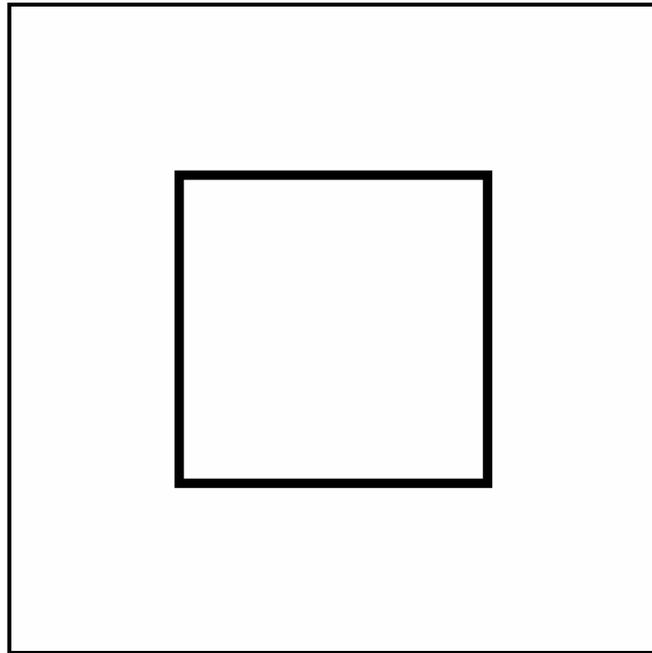
As imagens foram convertidas em escalas de cinza, extraindo-se a luminância de cada pixel (variando do zero, ou seja, ausência de luz até 255, brilho intenso). Esta é a escala perceptivelmente uniforme em relação à visão humana em cores (Van der Wouwer, 2000).



**Figura 7-** Imagem original corada (HE) da camada espinhosa, epiderme normal.

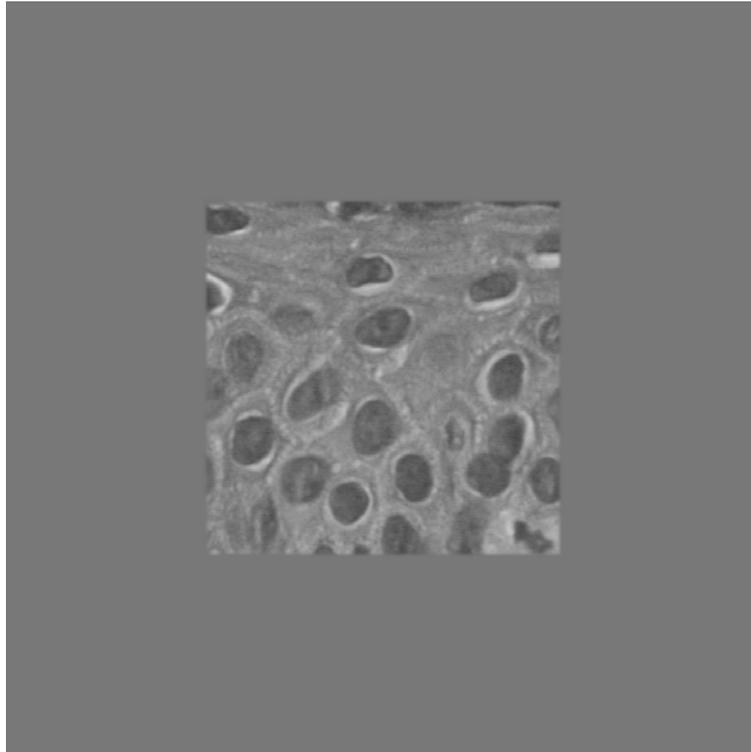
Devido à exigência do algoritmo para a transformada de Fourier de que as imagens sejam quadradas e que tenham cada lado medindo  $2^n$  (potência de 2), as imagens, em escala de cinza, foram colocadas dentro de uma moldura maior e, o espaço restante foi preenchido com nível de cinza médio da borda da imagem original. Esse procedimento diminui as descontinuidades nas bordas da imagem (diferenças bruscas de brilho). Essas descontinuidades produziriam artefatos na imagem transformada (anéis de Airy), formando linhas radiais nas regiões de altas frequências espaciais.

Para diminuir ainda mais esses efeitos, foi realizado o amaciamento com filtro de média numa região da imagem original, entre 3 erosões do contorno e 12 dilatações do contorno da imagem (Figura 8).



**Figura 8-** Filtro utilizado na imagem original para diminuir artefatos na imagem original

O filtro de média produz a suavização dos contornos da imagem original quadrada (Figura 9), diminuindo a nitidez dos contornos, isto é, as variações bruscas de luminância, que causariam uma grande quantidade de sinais de alta frequência espacial na vertical e na horizontal.

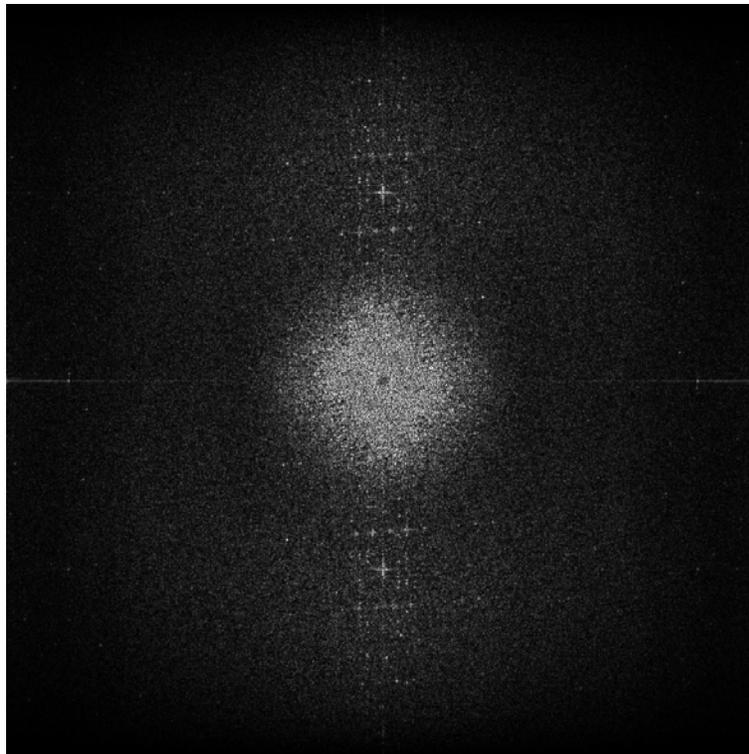


**Figura 9-** Imagem original já em escalas de cinza e com filtro pronta para ser transformada.

#### 4.6.3- A imagem transformada

Foi criada uma representação pseudotridimensional, no sentido horizontal, interpretando o nível de cinza (luminância) de cada *pixel*, como a altura de um eixo-z, agora interpretado como resultado de muitas funções harmônicas diferentes e sobrepostas. Utilizando o algoritmo FFT, foi transformada cada onda “oculta” da figura original em um par de *pixels* na imagem transformada (FFT), com pontos simétricos ao centro da imagem FFT. A direção da função harmônica representada pelos dois *pixels* é a linha entre os

pontos; a distância ao centro da imagem transformada é a frequência espacial e sua luminância é proporcional à amplitude da onda harmônica, i.e., a diferença entre os valores máximo e mínimo de cinza da função harmônica. Assim, cada par de *pixels* com pontos simétricos na imagem transformada representa uma função harmônica na imagem original. O conjunto de todos os pares de *pixels* da imagem FFT representa a soma das funções harmônicas correspondentes na imagem original. Para obter informações úteis calculamos os valores de amplitudes das ondas harmônicas que construíram a imagem microscópica. Amplitudes mais altas são equivalentes a um padrão repetitivo com maior contraste na imagem microscópica da epiderme.

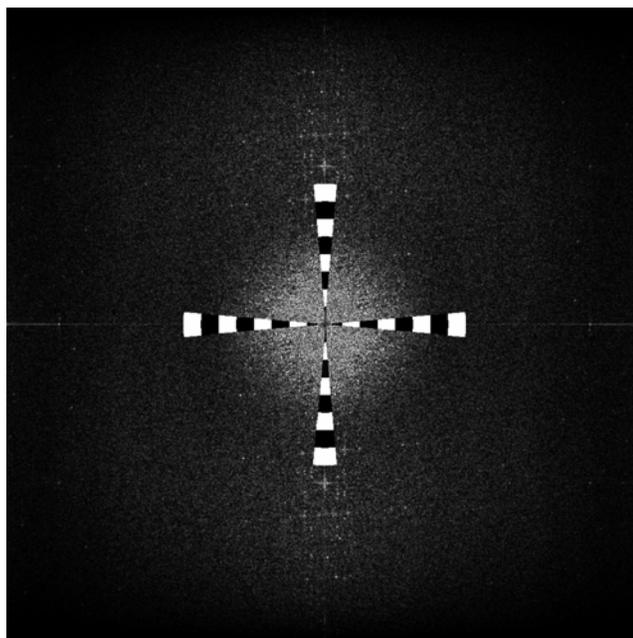


**Figura 10-** Imagem transformada

#### 4.6.4- Extração de características a partir da imagem transformada

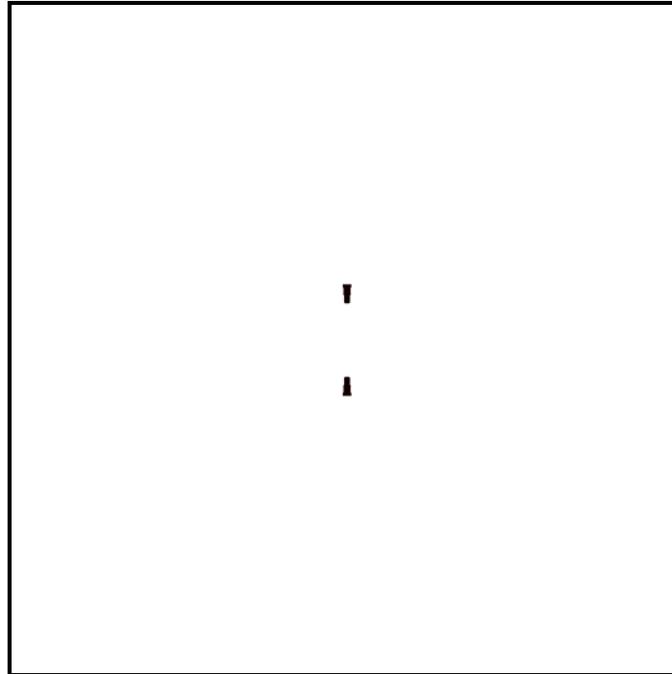
A imagem transformada detecta padrões de variação de luminância da imagem original, que se repetem em uma dada direção na imagem original. Um padrão que se repete a cada  $n$  *pixels* resultará num ponto intenso (função harmônica com grande amplitude), situado a  $N=L/n$  *pixels* de distância do centro, sendo  $L$  o número de *pixels* do lado da imagem transformada.

Uma forma de se detectarem padrões de repetição dentro de uma imagem transformada, diminuindo-se a quantidade de variáveis a serem testadas, é somar a amplitude das funções harmônicas em cada região da imagem transformada. Uma vez que a arquitetura epidérmica contém, predominantemente, células dispostas horizontalmente e verticalmente, analisamos os valores de amplitude nos setores horizontal e vertical (figura 11), em ângulos de 30 graus. Cada setor foi subdividido em 6 amplitudes de frequência, de zero a  $5\mu\text{m}^{-1}$  (ou períodos espaciais entre infinito e  $0,2\mu\text{m}$ , respectivamente) que foram comparados entre os pacientes-controle e os pacientes com SSL pelo teste t de student não pareado (nível de significância 0.05).



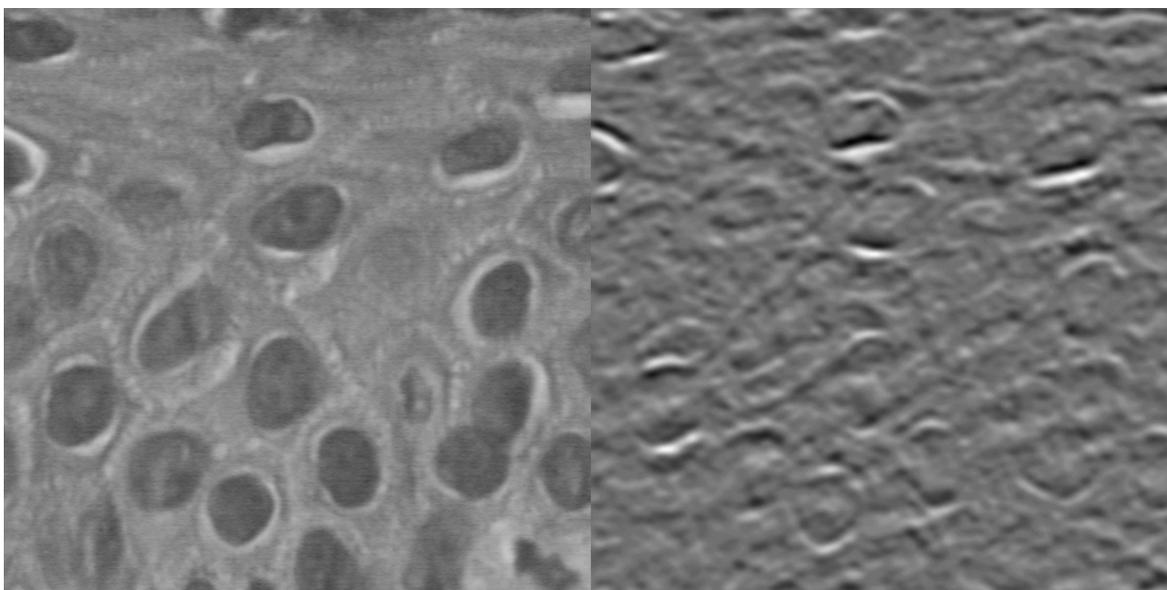
**Figura 11-** Valores de amplitude nos setores horizontal e vertical, em ângulos de 30 graus. Cada setor foi subdividido em 6 amplitudes de frequência.

Numa segunda etapa, definidas as regiões da transformada de Fourier onde se encontram as diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos de pacientes, foi possível construir-se filtros. Para tal, utilizaram-se as próprias regiões de *pixels* selecionadas pelos resultados dos testes. Esse filtro de “tudo-ou-nada” (Figura 12) apaga todas as *pixels* não selecionadas, tornando seus valores iguais a zero, exceto nas regiões selecionadas, onde os valores complexos são mantidos intactos.



**Figura 12-** Filtro de “tudo ou nada” onde as regiões de *pixels* nas quais não houve diferença na SSL e na pele normal foram apagadas (valores =zero).

Com essa imagem transformada de Fourier filtrada, foi realizada a transformação inversa (Figura 13). A finalidade era confrontá-la com a imagem original, permitindo, assim, a identificação de estruturas microscópicas, que foram ressaltadas como diferenças na FFT aparecendo, mais freqüentemente, e/ou mais intensamente, em um dos grupos de pacientes.



**Figura 13**

Esquerda: imagem original

Direita: imagem filtrada, ou seja, nova imagem virtual correspondente a original na qual só foram representadas as regiões onde houve diferença estatística entre os dois grupos.

Para obter uma estimativa de anisotropia, i.e., uma estimativa da variação das ondas ao longo de eixos em diferentes direções, calculamos o vetor resultante das amplitudes de freqüência designadas (Figura 14).

O comprimento do vetor resultante é dado por:

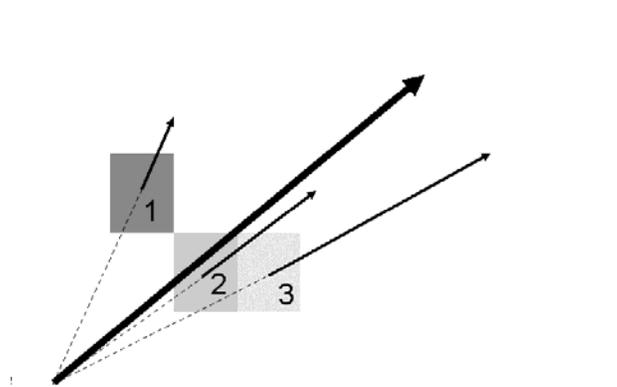
$$R = \sqrt{\left(\sum_i g_i \sin 2\alpha_i\right)^2 + \left(\sum_i g_i \cos 2\alpha_i\right)^2}$$

onde  $i$  indica o vetor  $i$ -th, que representa um pixel na metade direita da imagem FFT; o ângulo  $\alpha_i$  é a direção de cada vetor definido pela linha entre o centro da imagem FFT e o pixel  $(u_i, v_i)$ , equivalente a  $\arctan(v_i/u_i)$ ;  $g_i$  é o valor de cinza do pixel na FFT, definido por:

$$g_i = \sqrt{(u_i^2 + v_i^2)(R(u_i, v_i)^2 + I(u_i, v_i)^2)} = d \cdot |F(u_i, v_i)|$$

que indica a amplitude (em valores de cinza) da função harmônica em  $(u_i, v_i)$  na imagem FFT, onde  $R(u_i, v_i)$  e  $I(u_i, v_i)$  representam respectivamente as partes real e imaginária do valor complexo no pixel  $(u_i, v_i)$  na representação transformada de Fourier;  $d$  é a distância entre o pixel  $(u_i, v_i)$  até o centro da imagem FFT.

### Vetor resultante do espectro de Fourier



Centro da imagem transformada

**Figura 14-** Cálculo do vetor resultante de certa amplitude de frequência (1,2,3, representam os valores de cinza de três *pixels* da imagem transformada). A seta em negrito é o vetor resultante dos três vetores em questão.

A magnitude do vetor resultante de uma certa amplitude de frequência (anel) na imagem FFT é uma medida da anisotropia. Este valor é baixo se ondas harmônicas de igual amplitude fossem representadas em cada direção da imagem original, e alto quando há predominância de uma certa direção, como, por exemplo, quando há vários vetores em paralelo.

Finalmente, testou-se o poder discriminatório das diferentes variáveis de textura por uma análise discriminatória linear, onde determinou-se a importância de cada variável para “predizer” o diagnóstico correto. Para obter uma matriz de classificação mais realista, o método “leave-one out” (também chamado de procedimento “jack-knife”) foi aplicado, onde cada sujeito é classificado de acordo com os casos remanescentes (n-1). Este procedimento foi considerado o melhor método tendo em vista nossas amostras de tamanho relativamente pequeno. Quando necessário, as variáveis foram logaritimizadas, para obter distribuições normais para a análise discriminatória (LorandMetze e Metze, 1996; Irazusta et al., 1998; Cia et al., 1999), através do Software Winstat. Finalmente, com o objetivo de saber se os elementos da imagem poderiam influenciar os resultados da FFT, foram contabilizados os núcleos de cada imagem.

Além disso, foram analisadas as características de textura baseada nos níveis de cinza em uma imagem (características de Haralick). Estas características servem como medida para a diferenciação de texturas que não seguem um determinado padrão de repetitividade, fornecendo informações relevantes para a classificação das mesmas. Para tal, foram calculadas, de acordo com Haralick et al. (1973), as variáveis derivadas do cálculo de matrizes de coocorrências, que são matrizes que contam as ocorrências de níveis de cinza em uma imagem.

***5- RESULTADOS***

**Tabela 2 - Aspectos clínicos, histológicos e bioquímicos dos pacientes com SSL.**

| <b>Pacientes</b>      | <b>1</b>                           | <b>2</b>                           | <b>3</b>                | <b>4</b>                           | <b>5</b>                           | <b>6</b>                           | <b>7</b>                | <b>8</b>                           | <b>9</b>                           | <b>10</b>           |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Sex/idade<br>(anos)   | F/8                                | F/6                                | M/4                     | F/25                               | F/10                               | F/14                               | F/30                    | M/28                               | M/21                               | M/4                 |
| <b>Dermato</b>        |                                    |                                    |                         |                                    |                                    |                                    |                         |                                    |                                    | Moderada            |
| Ictiose               | Grave                              | Grave                              | Moderada                | Moderada                           | Moderada                           | Moderada                           | Grave                   | Moderada                           | Moderada                           | -                   |
| Prurido               | +                                  | +                                  | Moderado                | -                                  | -                                  | Focal                              | Focal                   | -                                  | +                                  |                     |
| <b>Neuro</b>          |                                    |                                    |                         |                                    |                                    |                                    |                         |                                    |                                    | Grave               |
| Retardo               | Grave                              | Grave                              | Moderado                | Grave                              | Moderado                           | Grave                              | Moderado                | Grave                              | Moderado                           | Proeminente         |
| Mental                | Proeminente                        | Proeminente                        | Proeminente             | Proeminente                        | Proeminente                        | Proeminente                        | Proeminente             | Proeminente                        | Proeminente                        | Aumentado           |
| Reflexos<br>tendíneos | Aumentado                          | Aumentado                          | Aumentado               | Aumentado                          | Aumentado                          | Aumentado                          | Aumentado               | Aumentado                          | Aumentado                          | Diplegia,           |
| Tônus                 | Diplegia,                          | Diplegia,                          | Paraparesia             | Diplegia,                          | Diplegia,                          | Diplegia,                          | Paraparesia,            | Diplegia,                          | Diplegia,                          | Confinado a         |
| Espasticidade         | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Confinado a<br>cadeira de<br>rodas | Deambula<br>com suporte | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Deambula<br>com suporte | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Confinado a<br>Cadeira de<br>rodas | Cadeira de<br>rodas |
| <b>Oftalmo</b>        |                                    |                                    |                         |                                    |                                    |                                    |                         |                                    |                                    |                     |
| Acuidade<br>visual    | Não testada                        | Não testada                        | Não testada             | Não testada                        | Não testada                        | Não testada                        | Reduzida                | Reduzida                           | Normal                             | Não testada         |
| “Dots”                | -                                  | -                                  | -                       | +                                  | -                                  | -                                  | -                       | -                                  | +                                  | -                   |
| Fotofobia             | -                                  | -                                  | -                       | +                                  | +                                  | +                                  | +                       | +                                  | +                                  | -                   |

| <b>Histológico</b>                |                 |                 |         |              |             |           |                 |                 |             |             |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|---------|--------------|-------------|-----------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|
| Local                             |                 |                 |         |              |             |           |                 |                 |             |             |
| Hiperqueratose                    | Abdomen         | Abdomen         | Abdomen | Lombar       | Lombar      | Lombar    | Braço           | Braço           | Braço       | Braço       |
| Acantose                          | +, Frouxa       | +               | +       | +, focal     | +, compacta | +, frouxa | +               | +               | +           | +           |
| Papilomatose                      | +               | focal           | +       | +, acentuada | +           | +, focal  | +, focal        | +               | +           | +           |
| Camada de células da granulosa    | +               | +               | +,focal | +, acentuada | +           | +         | +               | +               | +           | +           |
|                                   | 1.5             | 1.5             | 1.5     | 3.0          | 1.5         | 1.3       | 4.0             | 4.0             | Não contada | Não contada |
| <b>Outras alterações clínicas</b> |                 |                 |         |              |             |           |                 |                 |             |             |
|                                   | Hiper-salivação | Hiper-salivação |         |              |             |           | Hipotireoidismo | Hipotireoidismo |             |             |
| <b>Atividade FALDH</b>            | Não testada     | 2%              | 1%      | 3%           | 8%          | 3%        | <1%             | <1%             | 9%          | Não testada |

## 5.1- Estudo clínico

O grupo participante deste estudo foi formado por dez pacientes com SSL, sendo quatro homens e seis mulheres, com média de idade de 15 anos (4 -30 anos).

Todos os pacientes apresentaram ictiose, que estava presente desde o nascimento, de intensidade moderada a grave. A pele, com o passar dos anos, desenvolveu hiperqueratose de tom amarelo-acastanhado, principalmente nas flexuras, e liquenificação acentuada. Caracteristicamente, a ictiose no tronco e membros superiores manifesta-se por escamas lamelares, e nos membros inferiores por escamas são finas e furfuráceas. Espessamento da pele foi observado principalmente nos joelhos e nos cotovelos de todos os pacientes (figura 15). A pele da face central não foi afetada. A presença de prurido foi persistente nos pacientes #1, #2, #3 e #9, e nos outros foi localizado, aparentemente causado apenas pela asteatose. Cabelos, unhas e sudorese eram normais. Hiperqueratose palmo plantar foi notada apenas nos pacientes #7 e #8. A apresentação clínica do tipo “bebê colódio” ao nascimento não foi relatada em nenhum dos pacientes.

No exame clínico, observou-se boa interação doente-examinador, em que pese o quadro de retardo mental de moderado a grave. Entretanto os pacientes #1, #2, #4 não apresentavam comunicação verbal. Os demais apresentavam retardo na fala decorrente de disartria pseudobulbar. Os pacientes #1 e #2 apresentavam salivação intensa. Convulsões ocorreram apenas no paciente #1. Todos apresentavam espasticidade dos membros inferiores com reflexos profundos proeminentes e intensa hipertonia muscular. Os pacientes #3 e #7 deambulavam com suporte e os demais estavam confinados a cadeira de rodas.

Distrofia macular de retina, característica da doença, foi observada nos pacientes #4 e #9. Os pacientes #4 e #8 sofriam de intensa fotofobia, o que dificultou o exame oftalmológico. A acuidade visual era diminuída nos pacientes #7 e #8. Hipotireoidismo foi constatado nos pacientes #7 e #8 desde os dezoito anos de idade. Foi dosada a enzima FALDH em cultura de fibroblastos em oito pacientes e todos apresentaram menos de 10% de atividade enzimática normal. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

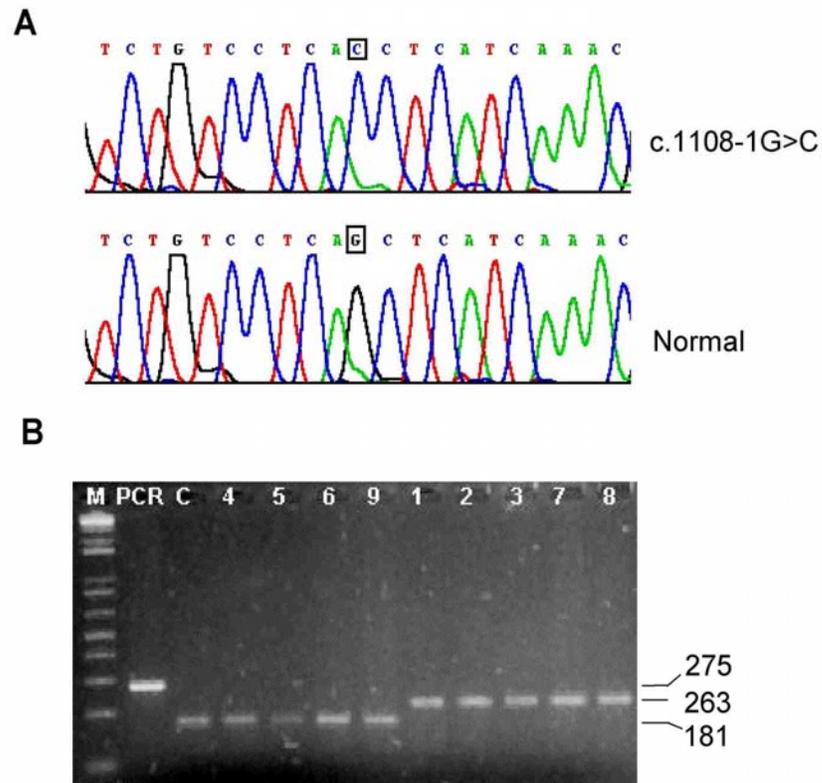


**Figura 15-** Da direita para esquerda: membro inferior do paciente #2 apresentando ictiose padrão lamelar; visão cervical posterior do paciente #4 com hiperqueratose acastanhada; face posterior da mão do paciente #4 ilustrando ictiose liquenificada com descamação nas extremidades dos dedos que se apresentavam de pele fina e brilhante; região cubital anterior do paciente #5 mostrando hiperqueratose com intensa liquenificação.

## 5.2- Caracterização molecular

O sequenciamento do gene *ALDH3A2* revelou uma mutação homozigótica c.1108-1G>C no intron 7 de todos os indivíduos afetados. Os genitores desses indivíduos eram heterozigóticos para a mutação, com exceção dos pais do paciente #9, que não foram testados. A mutação c.1108-1G>C elimina o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Dde I* na seqüência normal do gene. O status mutacional dos pacientes com SSL foi, portanto, confirmado pela digestão da enzima *Dde I*. Quando um produto de PCR do exon 8 com 275 bp (pares de bases) e suas seqüências intrônicas adjacentes foi submetido à digestão por *Dde I*, foi produzido um fragmento com 181 bp para os sujeitos-controles normais, enquanto a digestão do DNA de pacientes com SSL produziu um fragmento com 263 bp.

A análise dos haplótipos do gene *ALDH3A2*, utilizando 4 polimorfismos intragênicos de base única (*SNPs - single nucleotide polymorphisms*-nucleotídeos de base única) foi realizada para no mínimo um paciente de cada uma das 3 famílias. Foi verificado que todos eram homozigóticos para o haplótipo 1 segundo Rizzo et al.,1999.



**Figura 16**

**A** – Sequenciamento demonstrando a mutação c.1108-1G>C no intron 7 do gene ALDH3A2.

**B** - Produto de PCR do exon 8 submetido a digestão pela enzima *Dde I*: nos controles normais foram produzidos 3 fragmentos (181pb+82pb+12pb), enquanto que a mutação produziu dois fragmentos (263pb e 12 pb). Os fragmentos menores não são demonstrados no gel. Coluna M-marcador peso molecular. Coluna PCR-DNA não digerido. Colunas 4,5,6,9-DNAs controles submetidos a digestão com *Dde I*. Colunas 1,2,3,7-fragmentos de DNA dos pacientes #1,#2,#3,#7 e #8. Os números à direita indicam o tamanho do fragmento de DNA em pares de base.

### 5.3- Estudo de neuroimagem

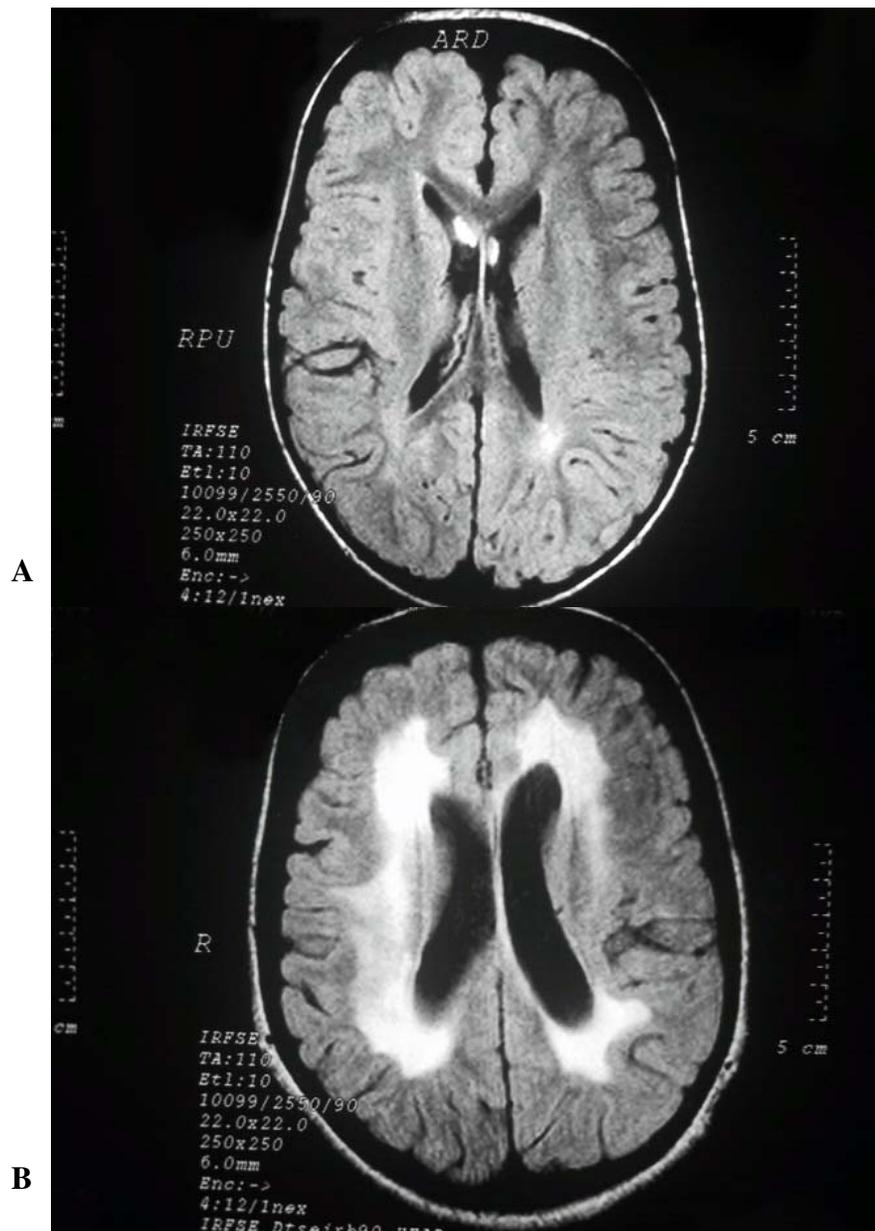
#### 5.3.1- Ressonância magnética

Os dados de imagem são resumidos na Tabela 3. Todos os pacientes apresentavam-se com hipersinal em TR longo (T2 e FLAIR) e iso/hipossinal em T1 (figura 17). As lesões eram infiltrativas, de limites mal definidos, sem efeito de massa e sem captação de contraste. A substância branca profunda foi mais acometida (incluindo áreas definidas na tabela como coroa radiada e centro semi-oval, fórceps maior e menor), sendo menos freqüente no corpo caloso e pedúnculos cerebrais, e ocorrendo nestas regiões apenas nos pacientes com acometimento grave (paciente 4) e ainda mais raras na substância branca subcortical.

**Tabela 3-** Achados de Ressonância Magnética

| Paciente | Idade | Clínica  | Intensidade | Substância Branca profunda | Fórceps maior | Fórceps Menor | Corpo caloso | Pedúnculos | Subcortical | Hidrocefalia |
|----------|-------|----------|-------------|----------------------------|---------------|---------------|--------------|------------|-------------|--------------|
| 1        | 8     | Grave    | Moderada    | +                          | +             | +             | -            | -          | -           |              |
| 2        | 6     | Grave    | Moderada    | +                          | +             | +             | -            | -          | -           |              |
| 3        | 4     | Moderado | Leve        | -                          | +             | -             | -            | -          | -           |              |
| 4        | 25    | Grave    | Grave       | +                          | +             | +             | +            | +          | +           | Leve         |
| 5        | 10    | Moderado | Moderado    | +                          | -             | +             | -            | -          | -           |              |
| 6        | 14    | Grave    | Grave       | +                          | +             | +             | +            | +          | -           |              |
| 7        | 30    | Moderado | Moderada    | +                          | +             | +             | -            | -          | -           |              |
| 8        | 28    | Grave    | Grave       | +                          | +             | +             | +            | -          | -           | Leve         |

Substância Branca: Coroa Radiada e centro semi-oval, idade: anos, + presente; - ausente.



**Figura 17**

Ressonância Magnética de Crânio

Corte axial-FLAIR-altura do corpo dos ventrículos laterais

A - Hipersinal leve - paciente 3

B - Hipersinal grave - paciente 4

### 5.3.2- Espectroscopia

Os resultados quantitativos da espectroscopia dos pacientes com SSL e dos controles estão na Tabela 4. Os pacientes com SSL apresentaram maiores níveis de colina que os controles, e menores níveis de NAA que os controles (Figura 18). Os sete pacientes com SSL apresentaram pico de lipídios, fato este inexistente nos controles normais. A relação NAA/Cre foi maior nos pacientes controles do que nos pacientes com SSL, já a relação Col/Cre foi maior nos pacientes com SSL do que nos controles.

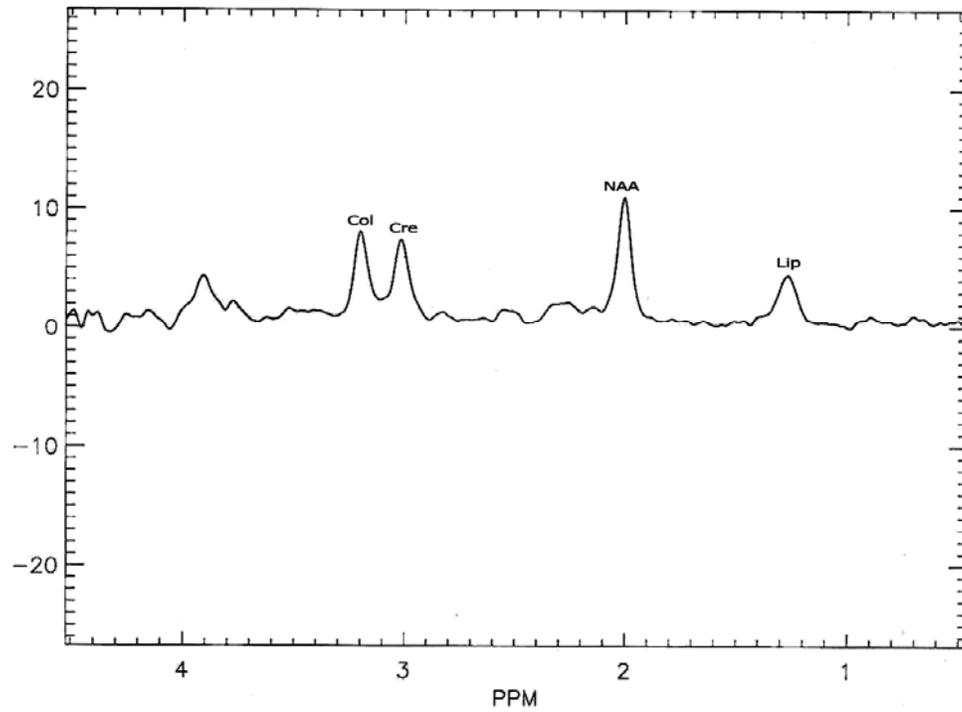
Os valores de NAA e Colina relativos a Creatina dos pacientes com SSL e dos controles são apresentados no Gráfico 1.

**Tabela 4** - Resultados quantitativos dos valores referentes à espectroscopia dos pacientes com SSL e pacientes *normais*.

| Pacientes      |               |                            |                            |                             |                     |
|----------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Ssl            | Local         | Colina                     | Creatina                   | NAA                         | Lipídios            |
| <i>normais</i> |               |                            |                            |                             |                     |
| 1              | Parietal      | 126.737<br><b>77,0508</b>  | 128.566<br><b>148,0880</b> | 157.807<br><b>149,52300</b> | 84.022<br><b>0</b>  |
| 2              | Frontal       | 132.849<br><b>42,9808</b>  | 107.361<br><b>30,8176</b>  | 159.630<br><b>76,61790</b>  | 55.042<br><b>0</b>  |
| 3              | Parietal      | 162.375<br><b>48,7693</b>  | 130.954<br><b>68,7751</b>  | 174.066<br><b>84,88820</b>  | 72.445<br><b>0</b>  |
| 4              | Parietal      | 124.731<br><b>119,809</b>  | 144.158<br><b>148,088</b>  | 171.111<br><b>231,155</b>   | 491.304<br><b>0</b> |
| 5              | Coroa radiada | 154.247<br><b>60,4029</b>  | 168.676<br><b>64,39700</b> | 209.979<br><b>133,3550</b>  | 0<br><b>0</b>       |
| 6              | Frontal       | 108.224<br><b>83,2120</b>  | 92.878<br><b>97,34750</b>  | 161.32<br><b>140,7320</b>   | 0<br><b>0</b>       |
| 7              | Parietal      | 159.525<br><b>170,3980</b> | 139.979<br><b>157,7140</b> | 263.132<br><b>268,9800</b>  | 70.148<br><b>0</b>  |
| 8              | Não realizado |                            |                            |                             |                     |
| 9              | Não realizado |                            |                            |                             |                     |

Valores em ppm: partes por milhão

## Elscint Spectroscopy



**Figura 18**

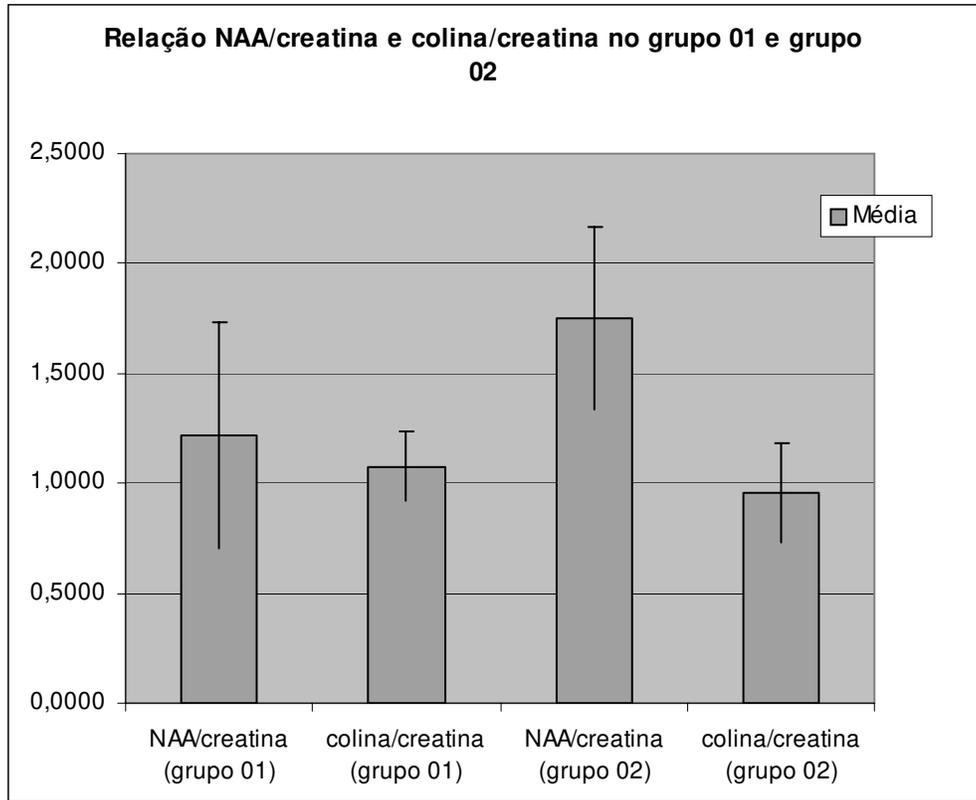
Espectroscopia de paciente com SSL.

Col-Colina

Cre-Creatina

NAA-N-acetil-aspartato

Lip-Lipídios



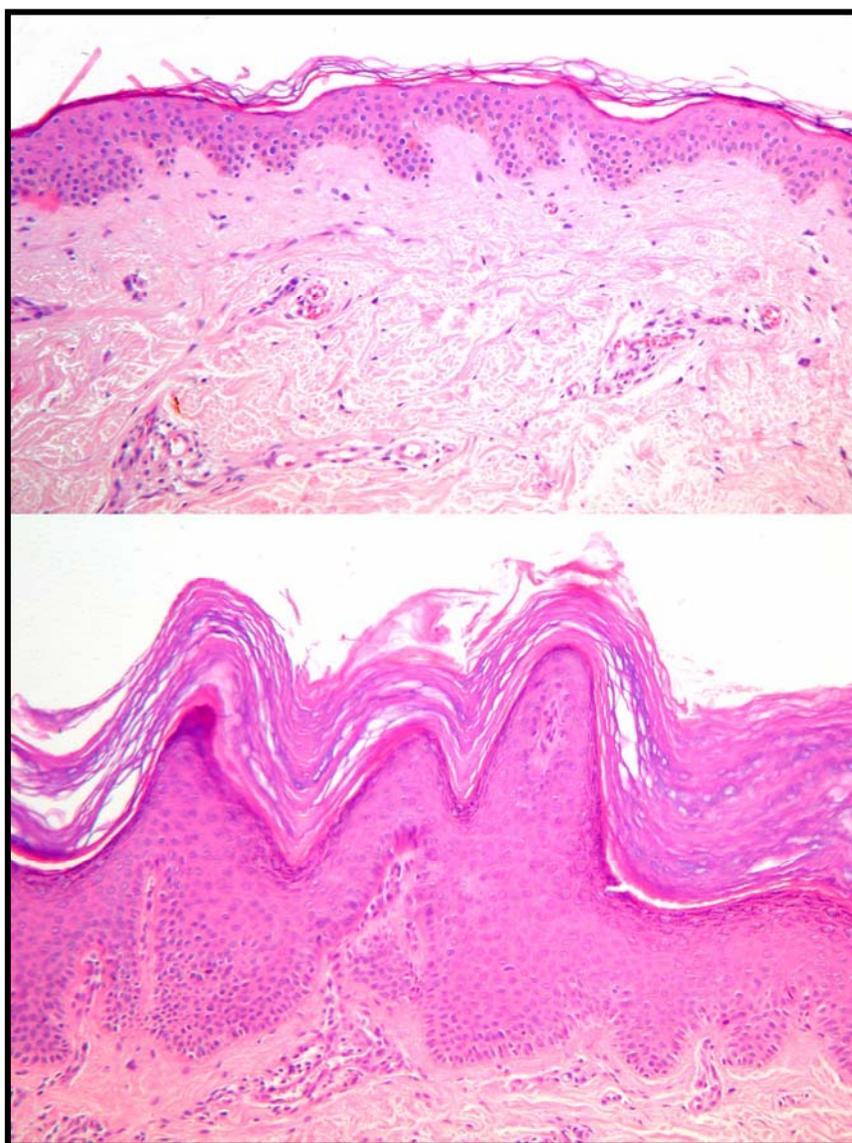
**Gráfico 1**

Grupo 1: pacientes com SSL, grupo 2: pacientes controles.

#### **5.4- Textura epidérmica**

Para o estudo histológico foi introduzido o paciente #10 que não se encontrava no estudo molecular e retirado o paciente #9. O grupo controle, para a análise de textura, foi composto por 17 voluntários sadios, sete do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com média de idade de 16 anos (9-40 anos) (Tabela 5).

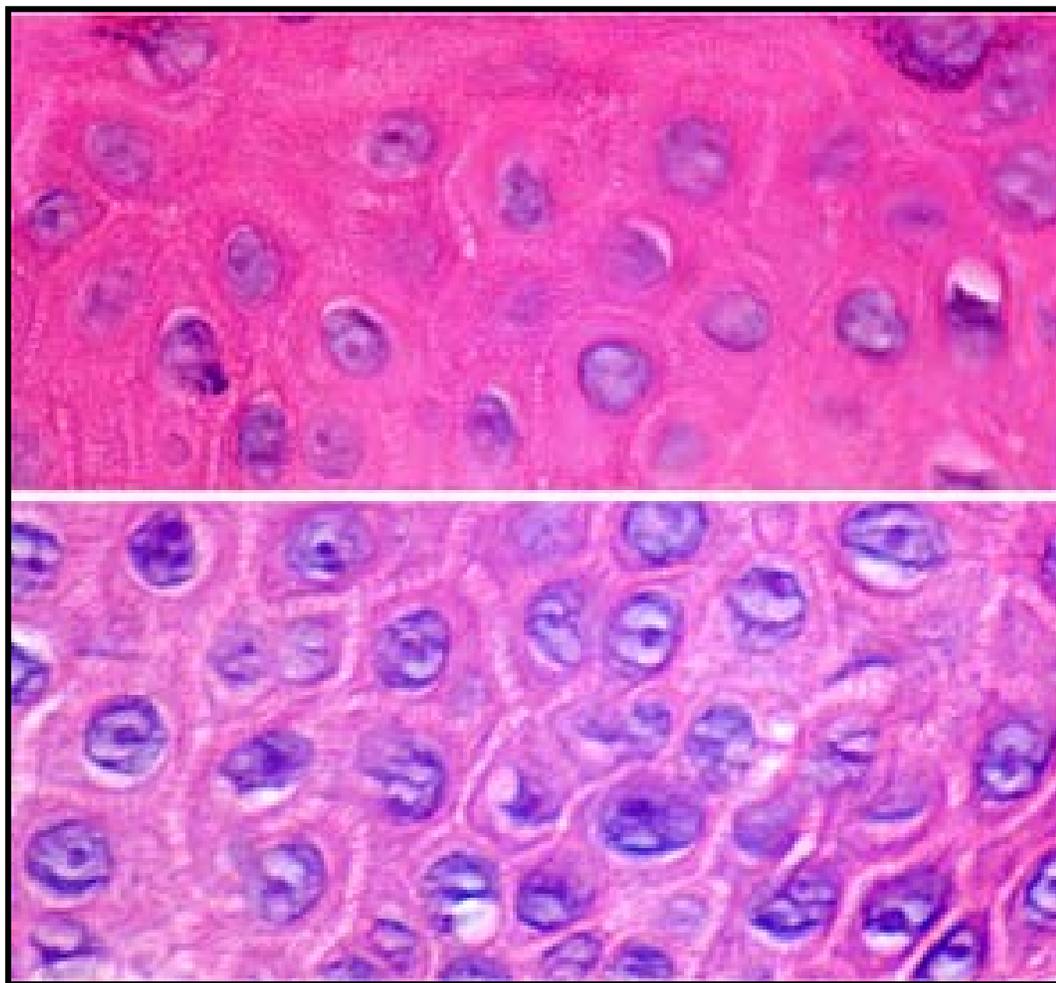
Os achados histológicos da epiderme dos pacientes com SSL foram comparados com os da epiderme normal de voluntários sadios, sendo constatadas hiperqueratose ortoceratótica, papilomatose e acantose da epiderme (Figura 19). O estrato granuloso variou de 1,4 a 4 camadas de células nos dez campos examinados de cada biópsia. Houve uma maior tendência dos pacientes mais velhos apresentarem a camada granulosa mais espessa. No maior aumento da área da camada espinhosa (suprapilar), observaram-se núcleos e nucléolos maiores e nucléolos mais numerosos na epiderme dos pacientes afetados comparativamente à da pele normal (figura 20). A carioteca dos queratinócitos da pele com SSL apresentava-se mais espessada. Não foi possível notar diferenças de arquitetura epidérmica entre os dois grupos, apenas um discreto achatamento das papilas da epiderme com SSL.



**Figura 19 -**

**Figura superior:** histologia da pele normal de um paciente controle.

**Figura inferior:** histologia de pele de paciente com SSL: hiperqueratose, papilomatose e acantose. (HE aumentox64)



**Figura 20** - Camada Espinhosa.

**Figura superior:** pele normal.

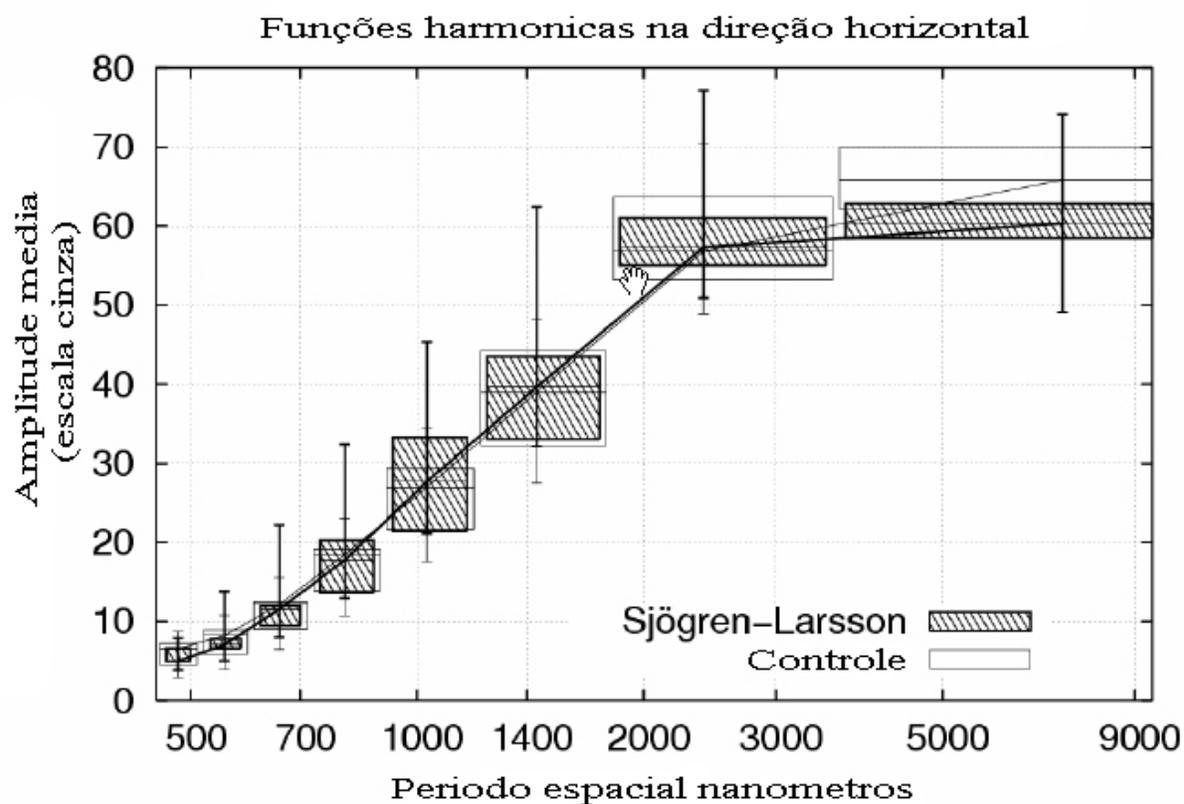
**Figura inferior:** pele com SSL. Núcleos e nucléolos maiores com halo pericucleolar na pele afetada (HE aumentox1000).

A contagem dos núcleos dos ceratinócitos, presentes em cada imagem digital, nos controles, mostrou 18,7 (14,5-23 núcleos por imagem) e, nos pacientes com SSL, foi de 21,1 (16,2-30,6 núcleos por imagem). Esta diferença não foi significativa, à análise estatística e não interferiu nos resultados da análise de textura pela transformada de Fourier. Não houve correlação entre o número de núcleos de cada imagem e a idade dos pacientes. A análise de textura baseada no cálculo dos níveis de cinza das matrizes de co-ocorrências (Haralick, 1973) não foi capaz de discriminar diferenças entre os dois grupos. Nas variáveis da FFT a direção mostrou ser o fator mais importante. A análise de textura não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as regiões de frequências na direção horizontal (Gráfico 2). Porém, houve diferenças significantes na direção vertical, correspondendo aos anéis 2 a 3, ou, em outras palavras, aos períodos espaciais (comprimentos de onda de 1,2 a 3,6 $\mu\text{m}$  (Gráfico 3). Também, na direção vertical, houve diferenças significantes entre os vetores resultantes nas regiões de 4 a 6, equivalentes aos períodos espaciais entre 0,6 a 1,2  $\mu\text{m}$  (Gráfico 4). Contudo, a melhor variável discriminatória foi o vetor resultante da região 6, equivalente às ondas espaciais de 0,6-0,72 $\mu\text{m}$ , predizendo um diagnóstico correto para 84% dos pacientes com SSL. Uma vez que este resultado não mudou após o procedimento “*jackknife*”, ele representa um modelo estável (Tabela 5). O acréscimo de variáveis adicionais segundo a metodologia de Haralick et al. (1973) não melhorou o modelo.

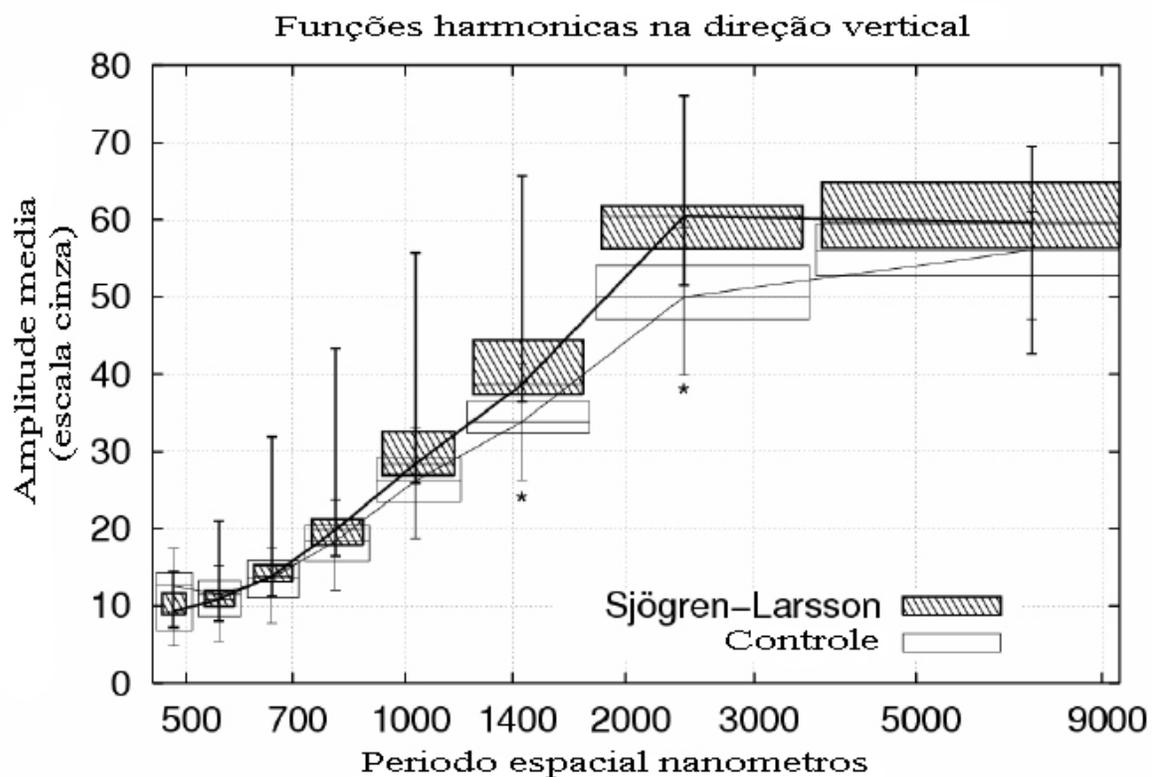
**Tabela 5-** Dados dos pacientes, valor do vetor resultante da região 6

| Caso                          | Idade | Sexo | Local | Vetor resultante<br>(região 6) | Diagnóstico preditivo |
|-------------------------------|-------|------|-------|--------------------------------|-----------------------|
| <b>Pacientes com<br/>SSL</b>  |       |      |       |                                |                       |
| 1                             | 6     | F    | T     | 62,0                           | Ssl                   |
| 2                             | 8     | F    | T     | 35,0                           | NI                    |
| 3                             | 14    | F    | T     | 199,7                          | Ssl                   |
| 4                             | 25    | F    | T     | 50,8                           | Ssl                   |
| 5                             | 27    | M    | A     | 45,2                           | Ssl                   |
| 6                             | 29    | F    | A     | 59,3                           | Ssl                   |
| 7                             | 10    | F    | T     | 46,8                           | Ssl                   |
| 8                             | 4     | M    | T     | 48,2                           | Ssl                   |
| 9                             | 4     | M    | A     | 30,3                           | NI                    |
| <b>Pacientes<br/>Controle</b> |       |      |       |                                |                       |
| 10                            | 10    | F    | T     | 30,8                           | NI                    |
| 11                            | 21    | F    | A     | 18,4                           | NI                    |
| 12                            | 10    | F    | T     | 45                             | Ssl                   |
| 13                            | 25    | F    | T     | 30,7                           | NI                    |
| 14                            | 12    | F    | T     | 36,3                           | NI                    |
| 15                            | 13    | F    | T     | 21,6                           | NI                    |
| 16                            | 17    | M    | T     | 25,6                           | NI                    |
| 17                            | 40    | F    | T     | 33,9                           | NI                    |
| 18                            | 36    | M    | A     | 38,4                           | NI                    |
| 19                            | 17    | M    | T     | 34,1                           | NI                    |
| 20                            | 11    | M    | T     | 26,2                           | NI                    |
| 21                            | 12    | F    | T     | 31,5                           | NI                    |
| 22                            | 9     | F    | T     | 26,8                           | NI                    |
| 23                            | 10    | F    | T     | 38,6                           | NI                    |
| 24                            | 25    | M    | T     | 34,2                           | NI                    |
| 25                            | 9     | M    | A     | 54,3                           | Ssl                   |
| 26                            | 11    | M    | A     | 29,7                           | NI                    |

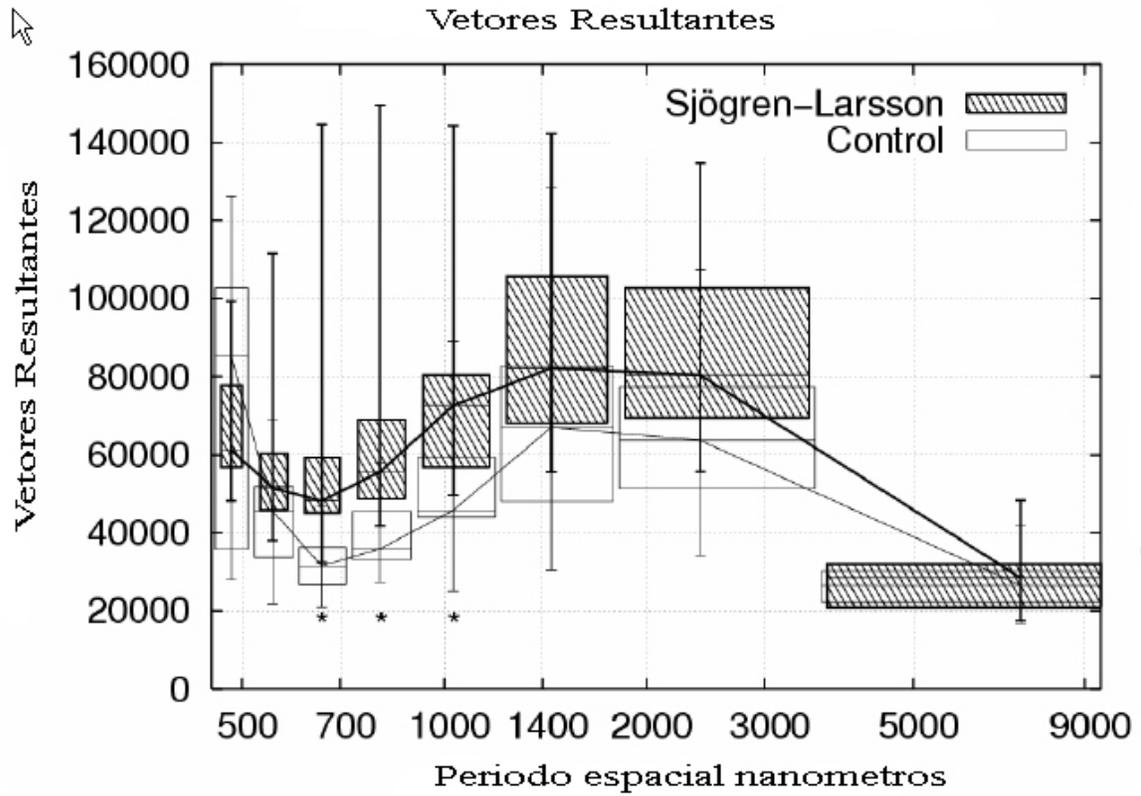
Pacientes 1 a 9: SSL; pacientes 10 a 26: grupo controle; idade em anos; local: T -tronco; A- antebraço. O comprimento do vetor resultante da região 6 (0,6-0,72  $\mu\text{m}$ ) em unidades arbitrárias. A última coluna apresenta os resultados da análise discriminatória após o procedimento de “jackknife” baseado no vetor resultante da região 6.



**Gráfico 2-** Amplitude média das funções harmônicas na direção horizontal. Não houve diferenças estatísticas entre os pacientes com SSL e os controles.



**Gráfico 3-** Amplitude média das funções harmônicas na direção vertical. As amplitudes foram maiores nos pacientes com SSL nas regiões onde as frequências variaram entre 1,4 a 4 $\mu$ m (diferença significativa com  $p < 0,05$ ).



**Gráfico 4-** Os vetores resultantes nos pacientes com SSL apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05\%$ ) nas regiões 4 e 6 , equivalentes aos períodos espaciais 0,6- 1,2  $\mu\text{m}$ .

## *6- DISCUSSÃO*

Desde que foi descoberto que a SSL é causada por mutações no gene da FALDH, 72 mutações foram identificadas nesta doença (Carney e Rizzo, 2004). Mutações foram encontradas em pacientes do mundo todo, com maior frequência na Europa, Estados Unidos e Oriente Médio (Rizzo e Carney, 2005). Até o momento, a mutação c.1108-1G>C foi a única identificada em pacientes brasileiros com SSL. Esta mutação foi inicialmente relatada no paciente #9, como uma de uma longa série de sujeitos com SSL (Rizzo, 2004), e posteriormente encontrada em nossos outros pacientes brasileiros. Pode-se concluir que a mutação c.1108-1G>C é um alelo causador da enfermidade comum no Brasil, pelo menos entre indivíduos residentes nas regiões Sul e Sudeste do país; no entanto, há dois outros pacientes com SSL na Espanha portadores da mutação c.1108-1G>C em estado heterozigótico (Rizzo e Carney, 2005).

Os pacientes deste estudo são pertencentes a três famílias não consanguíneas, mas é possível que tenham um ancestral comum, uma vez que apresentam a mesma mutação e o haplótipo intragênico *ALDH3A2* (Auada et al., 2006). De maneira semelhante a dos pacientes com SSL do norte da Suécia (Sjögren e LARSSON, 1957) um efeito fundador pode explicar esta mutação em pacientes brasileiros. No Brasil, pouco se conhece sobre a população de suecos entre os inúmeros imigrantes europeus dos séculos XIX e XX. É tentador especular se um antepassado comum, portador do alelo c.1108-1G>C, migrou da Europa para o Brasil e casamentos consanguíneos subseqüentes, conforme visto em cada uma dessas 3 famílias, resultaram no surgimento de pacientes homozigóticos com SSL. Assim, esta mutação poderia ter sido originária da Península Ibérica, e devido a eventos migratórios no século XVI ter sido introduzida no Brasil. Nos séculos XIX e XX, imigrantes de outras origens vieram principalmente para os estados do sul e suldeste, incluindo famílias originárias da Itália, Europa Central, Japão e países árabes, entre outros.

Várias mutações *ALDH3A2* comuns foram identificadas entre pacientes europeus, tais como a c.943C>T, responsável pela maioria dos acometimentos de pacientes com SSL suecos (De La urenzi *et al.*, 1997; Sillen *et al.*, 1997), c.1297\_1298delGA (Rizzo *et al.*, 1997), c.906delT e deleção do exon 9 (Kraus *et a.*, 2000). Com as mutações c.943C>T e c.1297\_1298delGA, cada um dos pacientes compartilha um haplótipo comum e provavelmente são relacionados geneticamente. Em contrapartida, pacientes com SSL de

famílias do Oriente Médio que são portadores de uma freqüente mutação c.682C>T podem ser agrupados em 3 diferentes haplótipos *ALDH3A2*, indicando que a mutação surgiu independentemente em várias ocasiões (RIZZO, 1999, Lossos et al., 2006). Provavelmente, esses pacientes com SSL não são geneticamente relacionados.

A mutação c.1108-1G>C é convenientemente detectada pela digestão, através da enzima de restrição *Dde I*, de um produto de PCR do exon 8, juntamente com suas seqüências adjacentes, o que oferece um rápido teste de triagem que pode ser diagnosticamente útil. A mutação altera o sítio de splicing na junção do intron 7 e do exon 8. Estudos com fibroblastos mostraram que a mutação resulta em duas transcrições anormais de mRNA, sendo uma com falta do 8, o que acarreta deleções dos aminoácidos 370-403, inserindo um stop códon prematuro, e a outra com falta dos exons 8 e 9, o que acarreta deleções dos aminoácidos 370-481 (Rizzo et al., 1999). Acredita-se que a tradução dessas transcrições cause uma profunda redução na atividade de FALDH. A atividade residual de FALDH que foi detectada em nossos pacientes é provavelmente devida à presença de outra enzima relacionada, responsável pela maior parte da atividade residual medida em células SSL (De Laurenzi et al., 1996).

Os mecanismos patológicos que vão da mutação no *ALDH3A2* aos sintomas de SSL não são bem compreendidos. A enzima FALDH normalmente catalisa a oxidação de aldeídos alifáticos de cadeia longa em ácidos graxos (Kelson et al., 1997). Os pacientes com SSL que têm deficiência desta enzima acumulam lipídios precursores, tais como aldeídos graxos, álcoois graxos e LTB<sub>4</sub>. O acúmulo de LTB<sub>4</sub>, e talvez seus derivados, parece ser responsável pelo prurido encontrado em SSL, uma vez que a inibição da síntese de LTB<sub>4</sub> pela droga zileutin abaixa o nível deste lipídio e alivia o prurido (Willemsen et al., 2001b). Os efeitos patológicos do acúmulo de álcoois graxos não são claros. Espera-se que os álcoois graxos se dividam nas membranas lipídicas e sejam direcionados para caminhos metabólicos alternativos que poderiam modificar a composição final das mesmas. Sabe-se que os aldeídos graxos reagem com fosfatidil etanolamina da membrana para formar um incomum glicerolipídio que pode alterar a função da membrana e contribuir para as características patológicas da SSL (James e Zoeller, 1997).

A relação entre o genótipo *ALDH3A2* e o fenótipo clínico da SSL é um assunto complexo que tem implicações práticas para o prognóstico da doença e a compreensão de sua patogênese molecular. Infelizmente, tem sido difícil estabelecer correlações entre genótipo-fenótipo no caso da SSL, uma vez que a maioria das mutações é única em cada família e usualmente afetam somente um ou dois irmãos. Nessas circunstâncias, não pode ser determinado se pacientes com o mesmo genótipo possuem um fenótipo consistente. Willemsen *et al.* (2001) concluíram que pacientes europeus com SSL e diversos genótipos mostraram pequena correlação entre genótipo-fenótipo, uma vez que os fenótipos não diferiam muito. Com exceção dos pacientes suecos com SSL, que, no entanto, são homozigóticos para a mutação c.943C>T, foram realizados apenas dois estudos com um grupo grande de pacientes com o mesmo genótipo. Mesmo esses pacientes suecos podem não revelar a extensão da variação fenotípica vista com outras mutações. O primeiro foi feito por Lossos *et al.* (2006) com uma amostra de pacientes do Oriente Médio apresentando a mutação c.682C>T e que diferiram no fenótipo neurocutâneo, o que os levou a concluir que mecanismos bioquímicos atuam nesta variabilidade. O segundo é este estudo com 9 pacientes brasileiros, que têm o mesmo genótipo *ALDH3A2*, o que oferece uma oportunidade para discutir a variação fenotípica em uma mutação (c.1108-1G>C). Sob esse aspecto, várias conclusões provisórias podem ser propostas a partir do genótipo-fenótipo desses pacientes.

Primeiramente, a ictiose em todos os pacientes era de moderada a grave. Este achado contrasta com a SSL como um todo, pois alguns pacientes têm ictiose leve. Como no caso dos pacientes suecos, nenhum dos pacientes brasileiros tinha um histórico de membrana de colódio ao nascer, o que tem sido relatado em 18% dos pacientes com SSL (Rizzo, 2001). A maioria dos pacientes não apresentou envolvimento palmar ou plantar. É de interesse notar que o prurido estava presente em alguns pacientes, particularmente aqueles que tinham ictiose mais grave, mas estava ausente em 3 dos 6 pacientes com ictiose moderada. Não foi introduzida terapia específica com retinóide, apesar de resultados muito bons, como alívio de prurido grave terem sido alcançados com acitretin para crianças com SSL e outras desordens hereditárias de queratinização (Willemsen *et al.*, 2001a). Não foram mensurados os níveis de LTB4 nos pacientes para verificar se havia correlação com prurido.

Em segundo lugar, a mutação c.1108-1G>C parece estar relacionada com comprometimento neurológico de moderado a grave, uma vez que a maioria dos afetados apresentava retardo mental grave e diplegia espástica, que os confinava a cadeira de rodas. Somente dois dos pacientes conseguiam se locomover com assistência. Todos tinham evidentes reflexos profundos dos tendões. Na SSL, há pequena correlação entre a gravidade da doença neurológica e aquela dos sintomas cutâneos, mas, neste caso, os pacientes tendiam a exibir um quadro consistentemente de moderado-grave de doenças neurológicas e da pele (Jagell e Heybel, 1982).

Em todos os pacientes o exame de ressonância magnética mostrou alteração de sinal TR longo (hipersinal em T2 e FLAIR), principalmente na substância branca profunda, sendo a captação do sinal mais intensa na região de coroa radiada, centro semi-oval, fórceps maior e menor e menos intensa no corpo caloso e pedúnculos cerebrais, que podem representar áreas com retardo na mielinização. A substância branca subcortical foi particularmente poupada. Willemsen et al. (2004) obtiveram o mesmo achado na sua casuística. O corpo caloso e os pedúnculos cerebrais são formados respectivamente pelas fibras axonais de associação inter-hemisféricas e pelos tratos da substância branca descendentes e ascendentes; o seu acometimento na SSL pode se referir ao mesmo padrão de outras doenças desmielinizantes que evolui com o acometimento dos grandes tratos de substância branca. Os mecanismos fisiopatológicos que levam a esse déficit ou retardo de mielinização são desconhecidos. Houve relação direta entre o exame clínico e o exame de ressonância nos pacientes 4, 5, 6, 7 e 8. Os pacientes 1 e 2 foram considerados graves na avaliação clínica e moderados na RM. O paciente 3 foi considerado moderado na avaliação clínica e leve na ressonância. O mesmo paciente 3 que apresentou o acometimento neurológico mais brando em relação aos demais foi o mesmo paciente para o qual foi introduzida dieta hipolipídica na tenra infância (Aauada et al., 2002). Porém, não é permitido afirmar tal efeito causal (dieta-acometimento neurológico mais brando) devido a outras vias endógenas de formação de álcool graxo.

No que se refere ao exame de espectroscopia houve pico aumentado de colina nos pacientes com SSL em relação aos pacientes controles. A colina no sistema nervoso central existe na forma livre e na forma de fosfocolina, e são observadas quantidades

maiores em processo inflamatórios e tumores, ou seja, doenças com “turnover” celular intenso, dado que coincide com o intenso “turnover” celular epidérmico da SSL, já observado no exame histológico cutâneo e confirmado na literatura. Segundo Willemsen et al. (2004), altos níveis de colina também indicam desmielinização ativa, mais condizente com a fisiopatologia da SSL. Na espectroscopia normal, o pico de NAA deve ser o dobro do pico de colina. Há, entretanto, redução nos pacientes com SSL devido, provavelmente, ao dano neuronal típico das doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla. Miyanomae et al. (1995) utilizaram a relação de NAA/Cre e também sugeriram baixos níveis de NAA no seu paciente com SSL de 25 anos. O pico aumentado de lipídios decorre do acúmulo de álcool graxo ou aldeído graxo no sistema nervoso central, sendo patológico e não ocorrendo nos pacientes normais. A presença do pico anormal de lipídios também ocorre com outras doenças desmielinizantes, incluindo doenças peroxiomais e esclerose múltipla, assim como em áreas necróticas com grande destruição de membranas lipídicas (Willemsen et al., 2004).

Degeneração macular com pontos brilhantes de cor amarelo-esbranquiçada é uma característica patognomônica da SSL, apesar da sua prevalência parecer ser altamente variável. Este achado tem sido relatado em 30% dos pacientes com SSL de origem global bioquimicamente confirmada (Rizzo, 2001), 20% dos casos diagnosticados clinicamente (Theile, 1974), e praticamente todos os pacientes suecos (Jagell, 1980). Entre 15 pacientes europeus, representando 10 diferentes genótipos *ALDH3A2*, pontos brilhantes foram vistos em todos (Willemsen et al., 2001 a). Os pontos brilhantes aparecem na infância e tendem a aumentar em número com o avançar da idade (Willemsen et al., 2000). O número de pontos brilhantes não está correlacionado à gravidade dos sintomas neurológicos ou cutâneos. Apesar dessa variação na prevalência relatada poder se originar em exames inadequados devido à fotofobia e falta de cooperação, alguns pacientes com SSL foram examinados adequadamente, e verificou-se que não apresentavam os pontos brilhantes. Somente dois dos nossos pacientes brasileiros os tinham, o que sugere que o aparecimento dos mesmos pode depender de outros fatores genéticos ou ambientais. Os pontos provavelmente não são responsáveis pela fotofobia experimentada por pacientes com SSL, uma vez que 4 de 5 pacientes brasileiros que sofriam de fotofobia não tinham os pontos brilhantes. Desde que a fotofobia pode ocorrer mesmo na ausência dos mesmos, alterações maculares mais sutis,

talvez anteriormente à formação dos pontos, podem ser responsáveis pela fotofobia em pacientes com SSL.

Os achados histológicos da pele não são específicos para a SSL. Características semelhantes podem ser vistas em outras ictioses e dermatoses variadas. As anormalidades são restritas à epiderme, com pouca ou nenhuma alteração da derme. Algumas ictioses apresentam particularidades que permitem caracterizá-las na microscopia óptica. Porém, na maior parte das vezes, são necessários métodos mais sofisticados como microscopia eletrônica ou técnicas de biologia molecular, como utilizadas neste trabalho. Na ictiose vulgar ocorre moderada hiperqueratose que se estende para os folículos pilosos, resultando em grandes rolhas foliculares, sendo a camada granulosa fina ou ausente (Hérmendez-Martínez, 1999). Na eritrodermia ictiosiforme congênita não bolhosa, a hiperqueratose é menos pronunciada, porém com acentuada acantose, sendo demonstrada renovação celular (*turnover*) aumentada. Na hiperqueratose epidermolítica, o substrato morfológico é facilmente identificado, podendo ser diferenciado das outras ictioses, pois se observa vacuolização das camadas granulosa e malpighiana, com grânulos de cerato-hialina dispersos no estrato granuloso vacuolizado (diGiovanna, 2003). Como já foi bem documentado, tais alterações histológicas podem, também, serem vistas no nevo epidérmico, ceratoderma palmoplantar, nevo comedoniano e no epitélio dos cistos epidérmicos (diGiovanna, 2004).

Todos os pacientes apresentaram hiperqueratose e papilomatose. Houve variação considerável quanto à textura da camada córnea (hiperqueratose compacta ou lamelada, difusa ou focal). Somente três dos pacientes apresentaram padrão lamelado (em cesta de vime) da camada córnea. A espessura do estrato granuloso variou de 1,5 a 4 camadas de células. É interessante notar que nos pacientes mais velhos, havia uma tendência à camada granulosa ser mais espessa, comparativamente com os mais jovens. Contudo, o valor destes dados era abrandado pela inconsistência quanto ao local onde foi coletada a biópsia de pele. Nos pacientes suecos portadores da SSL, uma investigação histopatológica pormenorizada da histopatologia da pele revelou que a camada granulosa se apresentava com espessamento de leve a moderado (Hofer e Jagell, 1982). Numa revisão de casos mais antiga de SSL na literatura, antes de ser conhecido o defeito enzimático ou genético, havia sido demonstrado

que a camada granulosa destes pacientes era normal (Goldsmith al., 1971). Entretanto, a revisão de outros casos, confirmados enzimaticamente, mostrou que a camada granulosa era normal ou espessa (Levisohn et al., 1991; Taube et al., 1999). Esta característica histológica, portanto, parece altamente variável na SSL e sem relevância diagnóstica por si só.

O método utilizado neste trabalho visava analisar, de forma quantitativa, a morfologia celular. Uma vez que as alterações morfológicas de uma célula refletem sua função, esta análise poderia contribuir para o entendimento da fisiopatologia do distúrbio de ceratinização envolvido na SSL. A quantificação do epitélio é usualmente feita pela análise isolada dos elementos celulares que deve ser feita por segmentação, o que ainda não é um procedimento padronizado (Garcia et al., 2004; Ranger-Moore et al., 2004). Contrariamente, neste estudo o interesse estava nas mudanças da arquitetura tecidual como um todo, sem seleção prévia dos elementos celulares. Isto foi possível pelo cálculo das matrizes de coocorrências dos níveis de cinza da imagem através da FFT (Metze et al., 2002). O método de Fourier pode ser usado também para a análise da forma nuclear. Recentemente, foi demonstrado que variáveis extraídas da transformada de Fourier podem revelar pormenores da cromatina em carcinomas basocelulares, indicativas de maior risco de recidiva (Metze et al., 2005). Ainda em dermatopatologia, resultados da análise de Fourier permitiram também diferenciar a arquitetura de fibras elásticas ou de fibras de colágeno em doenças dermatológicas. Assim, é possível quantificar elastose solar ou diferenciar quelóides de cicatrizes hipertróficas (Metze et al., 2002; Van Zuijlen et al., 2002).

Neste estudo, foi demonstrada a capacidade da FFT na detecção de sutis diferenças na arquitetura da epiderme de pacientes com SSL, quando comparada à da pele normal. Nenhuma das variáveis do método de Haralick foi capaz de distinguir ambos os grupos, mas com apenas uma variável da FFT foi possível discriminar entre os pacientes com SSL e os controles em 84,6% das vezes. A questão maior no emprego da FFT são os equivalentes morfológicos de sua análise. A distribuição espacial dos ceratinócitos sobre a membrana basal durante o processo de diferenciação da epiderme em camadas de células horizontais e verticais orientou a FFT nestas direções (vertical e horizontal).

Sob microscopia eletrônica foram demonstrados no citoplasma dos ceratinócitos das camadas córnea, granulosa e espinhosa corpos lamelares gigantes e em grande quantidade, tanto na pele normal quanto na pele ictiônica de pacientes com SSL. Esses corpos lamelares, além do seu grande diâmetro, apresentavam morfologia variada, ou seja, eram esféricos e ovóides (Shibaki et al., 2004). Foram observadas também, além dos corpos lamelares, estruturas anômalas provavelmente derivadas de organelas intracelulares (complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas e cisternas), tanto nas camadas granulosa como espinhosa, e que seriam incompletamente digeridas, na diferenciação terminal, permanecendo na camada córnea (Matsuoka et al., 1982). Em seus estudos, Mohrenschlager et al. (2005) constataram no estrato córneo da epiderme de pacientes com SSL a presença de vacúolos lipídicos com restos de membranas de colesterol. Com a FFT foi possível demonstrar um ritmo mais acentuado da distribuição das estruturas, na direção vertical, nos pacientes com SSL nos comprimentos de onda entre 1,2 e 3,6 $\mu$ m em relação aos pacientes controles. Porém, não houve diferenças na direção horizontal. As amplitudes foram maiores no grupo com SSL, correspondendo possivelmente aos núcleos e nucléolos de maior volume, nucléolos mais numerosos com halos perinucleares e espessamento focal de membrana nuclear dos ceratinócitos na SSL. Os achados adicionais nas organelas subcelulares vistos somente na microscopia eletrônica podem ser responsáveis por este espessamento do citoplasma.

Concomitantemente, as estruturas no grupo SSL foram mais anisotrópicas (períodos de 0,6 a 1,2 $\mu$ m). Justifica-se este fato pela retificação da epiderme nos pacientes com SSL, ou seja, como a epiderme é mais espessa nestes pacientes comparativamente aos controles, podem-se obter imagens com a base mais horizontalizada, enquanto que a ondulação dos ceratinócitos é mais evidente nos controles. A epiderme do grupo SSL apresentou um espessamento da membrana nuclear e nucleolar com halos perinucleares, todas estruturas foram reforçadas nos períodos de 1,2 a 3,6 $\mu$ m, Estes achados podem ser explicados pela maior síntese de DNA, na epiderme, na SSL, sendo descrita, também, uma produção mais rápida da camada córnea e uma renovação celular 3,5 vezes o normal (Jagel e Linden, 1982). Estes fatos resultam do distúrbio de ceratinização envolvido de forma que, a SSL, junto com outras formas de ictiose (como a hiperkeratose epidérmolítica e a ictiose eritodérmica congênita não bolhosa) constituem o grupo das ictioses

hiperproliferativas. Os mecanismos que induzem a hiperproliferação na SSL não são conhecidos. Os fatores genéticos são importantes, mas também se consideram fatores ambientais, como trauma, alterações inflamatórias e localização (joelhos, axilas e cubital) (Ito et al., 1991).

As diferenças estatisticamente significativas encontradas na direção vertical, mas não na direção horizontal, podem ser explicadas pelas seguintes considerações: a) a forma de muitos dos núcleos era elíptica achatada; b) o alinhamento nuclear era mais pronunciado na direção horizontal que vertical. Em outras palavras, os núcleos dos ceratinocitos se posicionam paralelamente à membrana basal da epiderme, ou seja, não se posicionam em colunas distintas no estrato espinhoso.

## *7- CONCLUSÕES*

Com base nos objetivos propostos, nos estudos realizados e nos resultados observados, seguem abaixo as conclusões:

- Os pacientes exibiram um fenótipo neurológico/cutâneo de moderado a grave semelhante. Foram encontradas variações nos sintomas ou sinais cutâneos e oculares que podem ser atribuídos a fatores genéticos e/ou ambientais não identificados.
- À ressonância magnética, os pacientes com SSL apresentaram retardo na mielinização da substância branca, provavelmente decorrente da anormalidade do metabolismo lipídico de base, uma vez que na espectroscopia houve pico anormal de lípidos em todos os pacientes estudados.
- Uma mutação c.1108-1G>C foi facilmente detectada pela enzima restrição *Dde I* de um produto de PCR do exon 8 e regiões adjacentes, sendo este um rápido teste de diagnóstico.
- Os pacientes brasileiros estudados com SSL apresentam uma mutação comum (c.1108-1G>C), que pode ser definida como um alelo causador da doença nos pacientes da região Sul e Sudeste do Brasil.
- A mutação c.1108-1G>C causa uma significativa redução da enzima FALDH, uma vez que todos os pacientes possuíram menos de 10% de atividade enzimática.
- As alterações estruturais identificadas pela FFT estão alinhadas com os achados ultraestruturais de componentes citoplasmáticos anômalos nos ceratinócitos, decorrentes do defeito metabólico de base. Pelo emprego da transformada de Fourier (FFT), foi possível diferenciar a textura epidérmica dos dois grupos estudados (SSL e controle) em 84,6% dos casos. Este método permitiu, de forma objetiva, detectar discretas alterações morfológicas em microscopia óptica convencional.

***8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Adam RL, Análise espectral usando a transformada de Fourier discreta para o estudo de núcleos celulares: elaboração de programa e aplicação no desenvolvimento do coração [Dissertação-Mestrado].Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;2002.

Auada MP, Taube MB, Collares EF, Tanaka AM, Cintra ML. Sjögren -Larsson syndrome:biochemical defects and follow up in three cases. Eur J Dermatol 2002; 12(3):263-6.

Auada MP, Puzzi MB, Cintra ML, Steiner CE, Alexandrino F, Sartorato EL, Aguiar TS, Azulay RD, Carney G, Rizzo WB. Sjogren-Larsson syndrome in Brazil is caused by a common c.1108-1G>C splice-site mutation in the ALDH3A2 gene. Br J Dermatol 2006; 154(4):770-3.

Bonafé JL, Peyraga C, Lafitte JM, Salvayre R, Rochicchioli P. Lê syndrome de Sjögren-Larsson, a propos d'un cas. Ann Dermatol Venereol 1987;114(8):947-55.

Brandling-Bennett HA, Liang MG. What syndrome is this? Sjogren-Larsson syndrome. Pediatr Dermatol 2005; 22(6):569-71.

Carney GW, Wei S, Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome: seven novel mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene *ALDH3A2*. Hum Mutat 2004; 24(2): 186.

Cia EMM, Trevisan M, Metze K. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology Cytopathology 1999; 10 (1): 30-9.

Digiovanna JJ. Ichthyosiform dermatoses. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz, SI, Fitzpatrick TB. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2003; 581-603.

Digiovanna JJ, Robinson-Bostom L. Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management. Am J Clin Dermatol 2003; 4 (2):81-95.

Digiovanna, J.J. Ichthyosiform dermatoses: so many discoveries, so little progress. J am Acad dermatol 2004; 51(1suppl):31-4.

De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Lyuben NM, Steinert PM, Compton JG, et al. Sjögren-Larsson Syndrome is Caused by Mutations in the Fatty Aldehyde Dehydrogenase Gene. *NaT Genet* 1996;12(1):52-7.

De Laurenzi V, Rogers G, Tarcsa E, Carney G, Marekov L, Bale SJ, et al. Sjögren -Larsson Syndrome is caused by a common mutation in northern European and Swedish patients. *J Invest Dermatol* 1997; 109(1):79-83.

Epstein EH, Williams ML, Elias PM. Biochemical abnormalities in the ichthyoses. *Curr. Probl. Derm.* 1987; 17:32-44.

Esteves W. Triglicerídeos de cadeia média (tcm): métodos preparativos e controle de sua absorção[Tese-Doutorado]. Campinas (SP):Universidade Estadual de Campinas;1980.

Ferreira CG, Pantton JS. Inhibition of lipolysis by hydrocarbons and fatty alcohols. *J Lipid Res* 1990; 31:889-97.

Garcia FAR, Ranger-Moore J, Barker B, Davis J, Brewer M, Lozevski J, Vinyak S, Liu Y, Yemane J, Hatch KD, Alberts DS, Bartels HG, Bartels PH. Karyometric image analysis for intraepithelial and invasive cervical lesions *Anal Quant Cytol Histol.* 2004 ; 26 (3): 141-150

Goldsmith LA, Baden HP, Canty TG. Sjögren-Larsson syndrome. Diversity of cutaneous manifestations. *Acta Derm Venereol* 1971; 51(5): 374-8.

Haddad FS, Lacour M, Harper JI, Fixsen JA. The orthopaedic presentation and management of Sjögren -Larsson syndrome. *J Pediatr Orthop* 1999; 19 (5):617-9.

Hanahan DJ. Platelet activating factor: A biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:483-509.

Haralick RM, Shanmuga K, Dinstein I. Textural features for image classification  
*IEEE Trans Systems, Man, Cybernetics*;1973; SMC3 (6): 610-621.

Haug S, Braun-Falco M. Adeno-associated virus vectors are able to restore fatty aldehyde dehydrogenase-deficiency. Implications for gene therapy in Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 2005; 296(12):568-72.

Heijer A, Reed WB. Sjögren -Larsson syndrome: congenital ichthyosis, spastic paralysis and oligophrenia. *Arch Dermatol* 1965; 92(5): 545-52.

Hempel J, Nicholas H, Lindahl R. Aldehyde Dehydrogenases: Widespread Structural and Functional Diversity within a Shared Framework. *Prot Sci* 1993;2:1890-1900.

Hérendez-Martínez A, González-Sarmiento R, Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol* 1999;141(4): 617-27.

Hernell O, Holmgren G, Jagell SF, Johnson SB, Holman RT. Suspected faulty essential fatty acid metabolism in Sjögren -Larsson syndrome. *Pediatr Res* 1982;16(1):45-9.

Hofer PA, Jagell S. Sjögren-Larsson syndrome: a dermato-histopathological study. *J Cutan Pathol* 1982; 9(6): 360-76.

Ichihara K, Kusunose E, Noda Y, Kusunose M. *Biochim Biophys Acta* 1986; 878:412-8.

Irazusta SP, Vassallo J, Magna LA, et al. The value of PCNA and AgNOR staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa *Pathol. Res.Pract.* 1998;194 (1): 33-9.

Iselius L, Jagell S. Sjögren -Larsson syndrome in Sweden: distribution of the gene. *Clin Genet* 1989; 35(4): 272-5.

Ito M, Oguro K, Sato Y. Ultrastructural study of the skin in Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 1991; 283(3):141-8.

Jagell S, Polland W, Sandgren O. Specific changes in the fundus typical for Sjögren -Larsson syndrome. An Ophthalmology study of 35 patients. *Acta Ophthalmol* 1980; 58(3):321-30.

Jagell S, Heijbel J. Sjögren-Larsson syndrome: physical and neurological features. A survey of 35 patients. *Helv Paediatr Acta* 1982; 37(6): 519-30.

Jagell S, Liden S. Ichthyosis in the Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Genet* 1982; 21(4): 243-52, 1982.

James PF, Zoeller RA. Isolation of animal cell mutants defective in long-chain fatty aldehyde dehydrogenase. Sensitivity to fatty aldehydes and Schiff's base modification of phospholipids: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23532-9, 1997.

Kelson TL, Secor M, Rizzo WB. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1997; 17 (1335): 99-110.

Kraus C, Braun-Quentin C, Ballhausen WG, Pfeiffer RA. RNA-based mutation screening in German families with Sjögren-Larsson syndrome. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(4): 299-306.

Kubo I, Muroi H, Kubo A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Biorg Med Chem*, 3(7):873-80, 1995.

Lacour M. Update on Sjögren -Larsson syndrome. *Dermatology* 1996; 193(2): 77-82.

Lacour M, Middleton-Price HR, Harper JJ. Confirmation of Linkage of Sjögren-Larsson Syndrome to Chromosome 17 in Families of Different Ethnic Origin. *J Med Genet* 1996;33(3):258-9.

Lahmar L, Frenk E, Gharbi R, Walzer C. Generalized ichthyosis associated with a spastic syndrome of the lower limbs, a variant of Sjögren-Larsson syndrome? Light and electron microscopy study of ichthyosis and its evolution with oral etretinate treatment. *Ann Dermatol Venereol* 1984; 111(10): 885-92.

Levisohn D, Dintiman B, Rizzo WB: Sjögren-Larsson syndrome: case reports. *Pediatr Dermatol* 1991; 8(3): 217-20.

Lindahl R, Petersen DR. Lipid Aldehyde Oxidation as a Physiological Role for Class 3 Aldehyde Dehydrogenase. **Biochem Pharmacol** 41 (11):1583-7, 1991.

Lohner K. Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structure manifested in the properties of biomembranes? *Chem Phys Lipids* 1996; 81: 167-84.

LorandMetze I, Metze K. AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol -Clin Mol Pathol*1996; 49: M357.

Losso A, Khoury M, Rizzo WB, Gomori JM, Banin E, Zlotogorski A, Jaber S, Abramsky O, Argov Z, Rosenmann H. Phenotypic variability among adult sblings with Sjogren-Larsson syndrome. *Arch Neurol* 2006; 63(2):278-80.

- Maaswinkel-Mooij PD, Brouwer OF, RIZZO WB. Unsuccessful dietary treatment of Sjogren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 1994; 124(5): 748-50.
- Mao T, Ono J, Kaminaga, T, Imai K, Sakurai K, Harada K, et al. Proton MR spectroscopy of Sjogren-Larsson syndrome. *Am J Neuroradiol* 1999;20(9):1561-3.
- Matsuoka,LY. Kousseff BG, Hashimoto K. Studies of the skin in Sjogren-Larsson syndrome by electron microscopy. *Am J Dermatopathol* 1982; 4(4): 295-301.
- Menkes JH. The leukodystrophies. *N England J Med* 1990; 332(1):54-55.
- Metze K, Silva PVVT, Adam RL, Cintra ML, Leite NJ. Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. *Anal Cell Pathol* 2002; 24: 196-8.
- Metze K, Adam RL, Silva PVVT, Gomes Neto A, Gomes AA, de Souza EM, Cintra ML, et al. Application of the new fast Fourier transform derived variables in dermatopathology. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 242.
- Metze K, Bedin V, Adam R L, Cintra ML, de Souza EM, Leite NJ. Parameters derived from the fast Fourier transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cell. Oncol.* 2005; 27: 137.
- Miyanomae Y, Ochi M, Yoshioka H, Takaya K, Kizaki Z, Inoue F, et al. Cerebral MRI and spectroscopy in Sjogren-Larsson syndrome: case report. *Neuroradiology* 1995; 37(3):225-8.
- Mohrenschlager M, Braun-Falco M, Ring J. Sjogren-Larsson syndrome: Indian and Central European similarities. *Pediatr Dermatol* 2005; 22 (6):569-71.
- Myauchi K, Masaki R, Taketani S, Yamamoto A, Akayama M, Tashiro Y. Molecular Cloning, Sequencing and Expression of cDNA for Rat Liver Microsomal Aldehyde Dehydrogenase. *J Biol Chem* 1991; 266:1936-42.
- Pigg M, Annton-Lamprecht I, Braun-Quentin C, Gustavson KH, Wadelius C. Further evidence of genetic homogeneity in Sjogren-Larsson syndrome. *Acta Derm Venereol* 1999;79(1):41-3.
- Pringle MJ, Brown KB, Miller KW. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? *Mol Pharmacol* 1981; 19(1):49-55.

- Rand RE, Baden HP. The ichthyoses-a review. *J Am Acad dermatol* 1983; 8(3):285-304.
- Ranger-Moore J, Bartels PH, Bozzo P, Einspahr J, Liu Y, Saboda K , Alberts DS : Karyometric analysis of actinic damage in unexposed and sun-exposed skin and in actinic keratoses in untreated individuals. *Anal Quant Cytol Histol* 2004 ; 26 (3): 155-165.
- Rizzo WB, Damman AL, CRAFT DA. Sjögren-Larsson Syndrome. Impaired Fatty Alcohol Oxidation in Cultured Fibroblasts due to Deficient Fatty Alcohol: Nicotinamida Adenine Dinucleotide Oxidoreductase Activity. *J Clin Invest* 1988; 81(3):738-44.
- Rizzo WB, Craft DA, Kelson TL, Bonnefont JP, Saudubray, JM, Schulman JD, *et al.* Prenatal Diagnosis of Sjögren-Larsson Syndrome using Enzymatic Methods. *Prenat Diagn* 1994; 14(7):577-81.
- Rizzo WB, Carney G, De Laurenzi V. A common deletion mutation in European patients with Sjögren-Larsson syndrome. *Biochem Mol Med* 1997; 62(2): 178-81.
- Rizzo WB. Inherited disorders of fatty alcohol metabolism. *Mol Genet Metab* 1998 65(2):63-73.
- Rizzo WB, Carney G, Lin Z. The molecular basis of Sjögren -Larsson syndrome: mutation analysis of the Fatty Aldehyde Dehydrogenase Gene. *Am J Human Genet* 1999; 65(6): 1547-60.
- Rizzo WB, Craft D. Sjogren-Larsson syndrome:accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. *J Lipid Res* 2000; 41(7): 1077-81.
- Rizzo WB, Heinz E, Simonn M, Craft DA. Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjogren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2001a; 1535(1):1-9.
- Rizzo WB, Lin Z, Carney G. Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjögren -Larsson syndrome. *Chem Biol Interact* 2001b; 30(1-3):297-307.
- Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome: fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. In: *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. New York: Ed. CR Scriver, K Beckman, GM Small, and D Valle, 2001.p.2239-58.v2.

ROGERS GR, Markova NG, De Lurenzi V, Rizzo WB, Compton JG. Genomic Organization and Expression of the Human Fatty Aldehyde Dehydrogenase Gene (FALDH). *Genomics* 1997; 39(2):127-35.

Sampaio S, Rivitti E. *Dermatologia*, 2 edição. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 2001p.765-1070.

Sands J, Auperin D, Snipes W. Extreme sensitivity of enveloped viruses, including herpes simplex, to long-chain unsaturated monoglycerides and alcohols. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 15(1):67-73.

Selmanowitz VI, Porter MJ. The Sjögren -Larsson syndrome. *Am j Med* 1967 42(3): 412-22.

Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H. Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in Japanese family of Sjögren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 2004;123(6):1197-9.

Sillen A, Jagell S, Wadelius C. A missense mutation in the FALDH gene identified in Sjögren-Larsson syndrome patients originating from the northern part of Sweden. *Hum Genet* 1997;100(2): 201-3.

Sjögren T. Oligophrenia Combined with Congenital Ichthiosiform Erythroderma, Spastic Syndrome and Macular Retinal Degeneration. A Clinical and Genetic Study. *Acta Genet Statist Med*, 1956;6(1):80-91.

Sjögren T, Larsson T. Oligophrenia in Combination with Congenital Ichthiosis and Spastic Disorders. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 1957; 32(113):1-112.

Snipes W, Person S, Keller G, Taylor W, Keith A. Inactivation of lipid-containing viruses by long-chain alcohols. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11:98-104.

Tabsh K, Rizzo WB, Holbrok K, Theroux N. Sjögren-Larsson Syndrome Technique and Timing of Prenatal Diagnosis. *Obstet Gynecol* 1993;82(4):700-3.

Taube MB, Billeaud C, Labréze C, Entressangles B, Fontan D, TAIEB A. Sjogren-Larsson syndrome: early diagnosis, dietary management and biochemical studies in two cases. *Dermatology* 1999; 198(4):340-5.

Theile U. Sjögren-Larsson syndrome. Oligophrenia--ichthyosis--di-tetraplegia. Humangenetik 1974; 22(2): 91-118.

Tsukamoto N, Chang C, Yoshida A. Mutations associated with Sjögren -Larsson syndrome. Ann Hum Genet 1997; 61(3):235-42.

Van den Brink DM, van Miert JM, Wanders RJ. A novel assay for the prenatal diagnosis of sfs. J Inherited Metab Dis 2005; 28(6):965-9.

Van de Wouwer GVD, Weyn B, Scheunders P, Jacob W, Marck EV, Dyck DV. Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei. Journal of Microscopy 2000,197 :25-35.

Van Domburg PH, Willemsen MA, Rottevell JJ, Jong JGN, Thijssen HO, Heershap A, Cruysberg JRM, et al. Sjögren-Larsson syndrome clinical and MRI/MRS findings in FALDH-deficient patients. Neurology 1999; 52(7):1345-51.

Van Zuijlen PPM, Vries HJC, Lamme EN, Coopkens JE, Van Marle J, Kreis RW, et al. Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. J Pathol 2002; 198(3): 284-91.

Vasiliou V, nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. Human Genomics 2005; 2(2):138-43.

Willemsen MA, Rottevell JJ, Van Domburg PH, Gabreels FJ, Mayatepek E, Sengers RC. Preterm birth in Sjögren-Larsson syndrome. Neuropediatrics 1999; 30(6):325-7.

Willemsen MA, Cruysber JRM, Rotteveel, JJ, Aandekerk AL, Van Domburg PH, Deutman AF. Juvenile macular dystrophy associated with deficient activity of fatty aldehyde dehydrogenase in Sjögren-Larsson syndrome. Am J Ophthalm 2000; 130(6):782-9.

Willemsen MA, IJlst L, Steijlen PM, Rottevell JJ, JONG JGN, Van Domburg PH, et al. Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjögren-Larsson syndrome. Brain 2001a; 124(pt7): 1426-37.

Willemsen MA, Lutt MA, Steijlen PM, Cruysberg JR, Van Der Graaf M, Sanden MW, et al. Clinical and biochemical effects of zileuton in patients with the Sjögren-Larsson syndrome. Eur J Pediatr 2001b; 160(12): 711-17.

Willemsen MA, Van Der Graaf M, Van Der Knaap MS, Heerschap A, Van Domburg PH, Gabreels FJ. MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *Am J Neuroradiol* 2004; 25(4):649-57.

Zoeller RA, Morsand OH, Raetz CRH. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 1988; 263(23):11590-6.

***9- ANEXOS***



## Anexo 1 - Resumo das principais ictioses

| ICTIOSE                      | MODO DE HERANÇA  | INÍCIO   | CLÍNICA E ASSOCIAÇÕES  | HISTOLOGIA                                      |
|------------------------------|--|--|--|---|
| Vulgar                       | Autossômica Dominante  | Infância   | Escamas finas, claras, não acomete flexuras<br>Hiperlinearidade palmoplantar,                        | Camada granulosa diminuída ou ausente           |
| Ictiose ligada ao X          | Recessiva ligada ao X.   | Nascimento, 1 ano de vida.<br>Mutações no gene Def. enzima esteróide sulfatase.<br>Criptorquídia               | Escamas escuras e grandes, região pré-auricular, pescoço e flexuras envolvidos, palmo e plantas nls. | Hiperqueratose. Camasa granulosa não específica |
| Ictiose lamelar              | Recessiva ligada ao X. Mutações no gene TGM1-transglutaminase-1 e também no gene A12 | Nascimento, bebê colóidio Ectrópico, eclábio, bebê colóide, prematuridade, eritrodermia ou não.                | Escamas grandes e espessas, generalizadas, flexuras afetadas, hiperkeratose palmoplantar             | Camada granulosa espessada                      |
| Hiperkeratose epidermolítica | Autossômica Dominante, mutações no gene KRT1 OU KRT10-Queratinas 1 e 10              | Nascimento e infância<br>Odor desagradável, infecções cutâneas eritrodérmica ou não.                           | Escamas verrucosas, grosseiras, bolhas   | Vacuolização da camada granulosa                |
| Doença de Refsun             | Autossômica Recessiva  | Infância, Surdez nervosa, retinite pigmentosa, polineuropatia, doença peroxissomal, acúmulo de ácido fitânico. | Ictiose leve e variável com hiperkeratose palmo plantar.   | Não específica                                  |

|  |  |   |  |                |
|--|--|---|--|----------------|
| Síndrome de Rud                                    | Autossômica Recessiva, mutações no gene PAHX ou PEX7 | Nascimento ou infância<br>Deficiência mental, baixa estatura, hipogonadismo, epilepsia,                               | Ictiose Lamelar  | Não específica |
| Síndrome de Netherton (Ictiose linear circunflexa) | Autossômica Recessiva, mutações no gene SPINK5.      | Nascimento ou Infância<br>Tricorrexia invaginada, dermatite atópica   | Ictiose linear, lesões policíclicas ou circinadas, cabelos curtos e frágeis com defeitos estruturais, Eritrodermia congênita ou bebe colóidio. | Não específica |
| Doença de Conradi                                  | Autossômica Recessiva                                | Nascimento ou Infância,<br>encurtamento úmero e fêmur, opacificação do cristalino, palato alto                        | Descamação em redemoinho, lesões atróficas após a cura   | Não específica |
| Síndrome CHILD                                     | Ligada ao x  | Nascimento ou primeiras semanas   | Eritrodermia ictiosiforme unilateral, seguindo as linhas de Blaschko   | Não específica |
| Síndrome KID                                       | Esporádica, mutações no gene GJB2-conexina 26        | Infância ou nascimento com eritrodermia, Surdez neurosensorial, ceratite, foliculites, otites, pneumonias recorrentes | Escamas finas, secas, hiperkeratose folicular espinulosa, ceratodermia palmoplantar  | Não específica |

|   |   |  |   |  |
|---|---|--|---|--|
| Síndrome Dorfman Chanarin                       | Autossômica Recessiva   | Nascimento ou infância, miopatia, vacúolos lipídicos nos leucócitos, alterações gordurosas hepáticas. Surdez neurosensorial e catarata | Semelhante a Eritrodermia ictiosiforme congênita  | Microscopia eletrônica gotas lipídicas nas membranas                                 |
| P.I.B.I.D.S.                                    | Autossômica Recessiva, mutações no gene XPD ou XPB.   | Nascimento, Aspecto progeróide   | Fotosensibilidade, ictiose cabelos quebradiços, retardo neuromotor, baixa fertilidade na estatura | Não específica   |
| Eritrodermia ictiosiforme congênita não bolhosa | Autossômica recessiva, mutações no gene de duas lipoxigenases que catalizam oxidação dos ácidos graxos- ALOXE3, ALOX12B | Nascimento, bebê colóidio  | Escamas mais finas e mais claras, melhora na Puberdade  | Hiperkeratose mais discreta, acantose acentuada, maior número de mitoses na epiderme |

## Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética



CEP, 04/08/05.  
(Grupo I)

### FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-7187

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

**PARECER PROJETO:** Nº 313/2005

**CAAE:** 0113.0.146.000-05

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PACIENTES COM SÍNDROME DE SJÖGREN-LARSSON”.**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mariam Patrícia Auada

INSTITUIÇÃO: FCM - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/06/2005

**APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/06**

### II - OBJETIVOS

Realizar correlação clínico, molecular e histológica dos pacientes com Síndrome de Sjögren-Larsson.

### III - SUMÁRIO

Farão parte do projeto nove pacientes acompanhados no ambulatório de genodermatose da FCM-UNICAMP, provenientes de famílias não relacionadas. Estes pacientes serão submetidos a avaliação dermatológica, neurológica e oftalmológica, além de exame de ressonância magnética, com espectroscopia. Farão também exames de sangue para extração de DNA e biópsia de pele para estudo histopatológico. Os mesmos exames serão feitos com 21 pacientes controle, que serão selecionados de pacientes já agendados para cirurgia dermatológica, menos a ressonância magnética.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto parece bem elaborado e exequível. O critério de seleção de pacientes e controles está claro. A pesquisadora respondeu a contento as questões levantadas pelos assessores e o TCLE está adequado.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

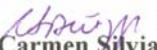
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2005.

  
**Prof.ª Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

***10- APÊNDICES***

**Apêndice 1-** Auada MP, Taube MB, Collares EF, Tanaka AM, Cintra ML. Sjögren-Larsson syndrome: biochemical defects and follow up in three cases. *Eur J Dermatol* 2002; 12(3):263-6.

Clinical report

*Eur J Dermatol* 2002; 12: 263-6

Mariam Patrícia AUADA  
Maria Beatriz Puzzi TAUBE  
Edgard F. COLLARES  
Ana Maria Uthida TANAKA  
Maria Leticia CINTRA

**Sjögren-Larsson syndrome:  
biochemical defects and follow up in three cases**

M.P. Auada, M.B.P. Taube, A.M.U. Tanaka : Department of Dermatology, University of Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Caixa postal 1170 Cep: 13083-970, São Paulo, Brazil.  
E.F. Collares : Department of Pediatrics, University of Campinas, São Paulo, Brazil.  
L. Cintra : Department of Pathology, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Reprints: M.P. Auada.  
Fax: (+55) 19 37887602  
e-mail: mauada@terra.com.br

Sjögren-Larsson syndrome is a rare disorder that consists of congenital ichthyosis and neurological symptoms due to an enzymatic defect of fatty aldehyde dehydrogenase in the fatty alcohol cycle. We report three cases of Sjögren-Larsson syndrome in which the primary biochemical defect was established in two patients (patient 2: 175 pmol/min/mg; patient 3: 103 pmol/min/mg protein enzymatic activity in fibroblasts in skin, while normal controls were  $8,860 \pm 1,624$ , n: 22 ). A dietary program was proposed: reduced total fatty intake at 30% of total calories, n-3 and n-6 acids (canola oil) as well as unsaturated fatty acids (<sup>®</sup>Milupan milk). Topical keratolytic agents were used too. Good clinical course was observed in one of the patients in whom dietary intervention was started in early infancy. In the other two patients, who started the therapy later (five and three years old), cutaneous symptoms were improved after treatment. (*Key words: biochemical defects, diet therapy, ichthyosis, neurologic abnormalities, Sjögren-Larsson syndrome.*)

Sjögren and Larsson first described this disorder in 1956 and 1957, respectively. They reported 28 cases coming from Vasterbotten and Norrbotten provinces in Sweden [1]. Consanguinity was established in 8 of 13 families in which both parents were known [1]. They concluded that all Swedish cases could be determined by a single mutation that occurred in one heterozygote gene about 600 years ago [2]. In those provinces the incidence of the syndrome had been estimated as 2.7 per 100,000 births [1, 3]. (The overall incidence in Sweden was 0.4 per 100,000 births). The incidence worldwide is estimated to be 0.4/100,000 [1, 3].

Sjögren-Larsson syndrome (SLS) is an autosomal recessive disorder characterized by congenital ichthyosis, mental retardation, spastic paraplegia or tetraplegia, speech defects and epileptic type convulsions [4, 5]. Ophthalmological abnormalities are said to occur in about 30 percent of affected individuals and include glistening white dots located in foveal and parafoveal regions, blepharites, conjunctivitis, and punctate corneal erosions [4, 6]. Other features of the syndrome reported in some patients are dental and/or osseous dysplasia and hypertelorism [7]. Ichthyosis is usually present at birth, though neurologic symptoms become apparent during the first or second year of life [4-7].

Patients have been found to have impaired fatty alcohol oxidation due to deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) component of the complex enzyme fatty alcohol nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase (FAO), which is necessary for the oxidation of fatty alcohol to fatty acids. In most patients, plasma levels of fatty alcohols (hexadecanol and octadecanol) are increased. In addition the serum levels of certain polyunsaturated fatty acids decrease, especially the delta-6 desatu-

ration products of linoleic acid [8-10]. This defect in fatty alcohol metabolism in the skin and the central nervous system (CNS) is believed to be responsible for the clinical manifestations [8-10].

The SLS is caused by a mutation in the ALDH3A2 gene which encodes FALDH activity. It is located in 17p11.2, close to the neurofibromatosis-1 gene and consists of 10 exons and 9 introns and 31 kilobases [4, 11]. The DNA for FALDH encodes a protein of 485 amino acids. This protein has a hydrophobic carboxylterminal amino acid sequence that is necessary for microsomal membrane anchoring. Molecular studies revealed at least eight different mutations in the FALDH3A2 gene in SLS [5, 11].

We followed three cases of SLS. They are siblings and their parents are consanguineous. A laboratory study was done with measurement of FALDH activity in fibroblast skin in two cases. Furthermore a dietary therapy was introduced in an attempt to improve dermatological and neurologic manifestation.

**Cases report**

**Patient 1**

A 5-year-old girl presented at birth erythematous and thickened skin without other associated abnormalities. At 10 months of age she was hospitalized because of spasticity associated with delayed psychomotor development. Currently she has a marked dark brown and lichenified hyperkeratosis most prominent on the elbows and knees (*Fig. 1*). Pruritus was the major problem for the mother. Neurologic examination showed a pyramidal syndrome that was more obvious in her lower limbs, diffuse hyperre-

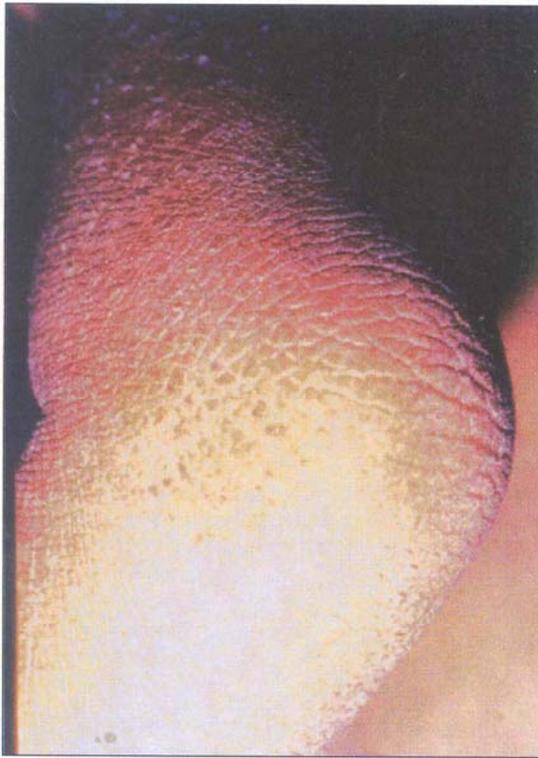


Figure 1. Patient 1: Close-up of skin on the knees.

flexia and pseudobulbar syndrome. She understood simple orders but she was mute. A severe diffuse leukodystrophy was evident on the magnetic resonance imaging (MRI). Ophthalmologic examination was normal. A biopsy specimen of the abdominal skin revealed orthokeratotic hyperkeratosis, slight papillomatosis and acanthosis. The granular cell layer was conspicuous, but thin in some areas. (Fig. 2).

#### Patient 2

The 3-year old sister of patient 1 was born with diffuse redness of the skin, which gradually faded. During childhood, the skin became dry, with generalized itching and yellow-brown hyperkeratosis. There was a lichenified appearance of the skin of the abdomen and flexural areas. The central face was spared. Ophthalmologic examination was normal. She had a very ataxic gait and walked only when supported. Pyramidal hypertonia was present. Intelligence was delayed for her age and she was unable to speak full sentences. Leukodystrophy was evident on MR. A skin biopsy specimen of the abdomen showed hyperkeratosis, acanthosis, papillomatosis and a stratum granulosum was present.

#### Patient 3

This male child, brother of patients 1 and 2, was born with diffuse erythema and scaling of the skin (Fig. 3). Now he

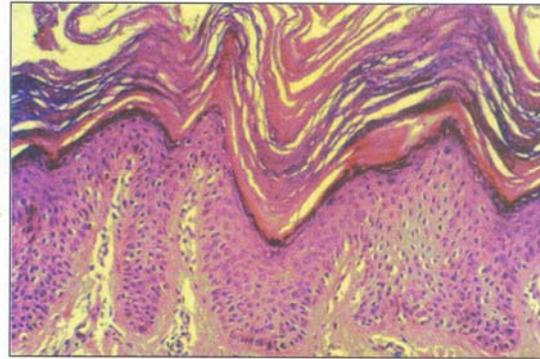


Figure 2. Histopathological study of case 1 showing hyperkeratosis, papillomatosis and a thick granular cell layer.



Figure 3. Patient 3 at 1 day of age with diffuse erythema and scaling.

is 10 months old, his skin is thick but without hyperkeratosis. His neurologic and psychomotor development is normal so far.

#### Laboratory studies

FALDH activity in fibroblasts found in skin biopsies of cases 2 and 3 was measured by Dr. W. Rizzo (Department of Pediatrics, Medical College of Virginia, Richmond, USA). These studies revealed reduced FALDH activity. Patient 2 showed 175 pmol/min/mg and patient 3 showed 103 pmol/min/mg protein enzymatic activity while normal controls were  $8,860 \pm 1,624$  (n = 22) (Table 1).

Table 1. Fibroblast enzyme activity (pmol/min/mg protein) of fatty aldehyde dehydrogenase

| Patient | Fatty Aldehyde Dehydrogenase (FALDH) | Sjögren-Larsson Syndrome              | Normal Controls                               |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| 2       | 175                                  | 593 ± 349 (n: 70)<br>range (62-1,928) | 8,860 ± 1,624 (n: 22)<br>range (5,859-12,060) |
| 3       | 103                                  | 593 ± 349 (n: 70)<br>range (62-1,928) | 8,860 ± 1,624 (n: 22)<br>range (5,859-12,060) |

## Treatment

Considering that the biochemical defect in SLS consists mainly in increased fatty alcohol production, possibly associated with fatty acid deficiency, we proposed the following dietary therapy: reduced fatty intake to 30% of total caloric intake. To correct delta 6 desaturation products deficiency of linoleic acid, we supplemented the diet with canola oil given orally and used as emollient, plus high unsaturated fatty acids using Milupan milk (percentage of fatty acid content: docosahexaenoic acid – 0.3% and arachidonic acid – 0.4%). The baby was breastfed up to 6 months of age and received two daily doses of cholestyramine (2 grams), a bile acid-binding resin. At present foods are cooked only in medium-chain triglyceride oil (TCM). Topical keratolytic agents and moisturizing creams are used to improve the ichthyosis.

## Results

After therapy was introduced, the children have been followed for 12 months. In patients 1 and 2 skin symptoms of ichthyosis improved greatly. Pruritus was markedly decreased in all patients. But there was only slight clinical neurologic improvement in patient 2 and no improvement at all in patient 1. Patient 3 has not presented pronounced ichthyosis like his sisters up to now and his neuropsychomotor development is normal. We hope that with the early diet prescription, practised from his first month of life, this child will have a better neurologic prognosis and improved cutaneous ichthyosis.

## Discussion

Since the original description in 1957, over 200 cases of SLS have been reported all the world [1]. Based on our observation we would like to emphasize the importance of cutaneous clinical features to make the diagnosis of SLS in the first six months of life, before the onset of neurologic symptoms. Generalized ichthyosis is usually present at birth and brings the patient to medical attention [4, 5]. A true collodion-like membrane is rarely seen. In the neonatal period the affected infants exhibit varying degrees of erythroderma, which tends to gradually fade with age [12]. The typical skin changes become evident during the first months of life and fully developed ichthyosis is usually present by one year. There is a generalized hyperkeratosis more pronounced on the lateral sides of the trunk, neck, flexural areas and lower abdomen, with marked pruritus [8, 12]. Thickened areas may be yellow to brown in color and

have a lichenified appearance with accentuated skin markings [11, 13]. The central face is spared, and ectropion is rarely present [4, 13]. There is no loss of eyelashes or eyebrows. The nails and scalp are normal [14]. The palms and soles may be involved, but usually only to a slight degree. The ability to sweat is generally normal [5]. Clinical distinction from other autosomal-recessive ichthyosis phenotypes (e.g. lamellar ichthyosis or congenital ichthyosis erythroderma) may be difficult until the CNS or ocular manifestations of the syndrome are expressed [4, 5, 12].

Histologically, orthokeratotic hyperkeratosis, acanthosis and papillomatosis can be observed in the epidermis. The horny layer shows a basket-weave appearance. The granular cell layer may be slightly thickened or not. The subepidermal blood vessels are somewhat dilated, accompanied by a little infiltration of round cells. On the other hand, uninvolved skin is almost normal [15, 16].

Neurologic symptoms include severe mental retardation, abnormal reflexes, muscular hypertonia and leg paresis. Spasticity becomes apparent between 4 and 30 months of age. The symptoms progress slowly and usually stabilize. Mental retardation is often severe and parallels the extent of spasticity. Computerized tomography (CT) scan does not show any suggestive features, but severe leukodystrophy is evident on MR scans. This has been confirmed in neuropathological studies, which demonstrate loss of myelinated axons in the central cerebral white matter, corticospinal and vestibulospinal tracts [14, 17]. Loss of neurons in the cortex and basal ganglia has also been described. Speech deficits are frequently observed and are related to the spastic disorder [14, 17, 18]. Seizures are not infrequent. Short stature is not primary but results from neurologic impairment [4, 14, 17].

In 1988, Rizzo *et al.* found that the oxidation of fatty alcohol in patients is impaired for the deficiency of FALDH and FAO [9]. FALDH is a complex enzyme which first catalyses fatty alcohol to fatty aldehyde (fatty alcohol dehydrogenase, FALDH) and then fatty aldehyde to fatty acid (FALDH) [19]. Subsequent studies confirmed these enzymatic deficiencies in cultured skin fibroblasts and leukocytes and demonstrated fatty alcohol accumulation (hexadecanol and octadecanol) in plasma [8, 10, 20]. Fatty alcohol is a substrate for the biosynthesis of wax esters in the skin and glycerol ether lipids in myelin [10, 20, 21]. This enzyme defect is specific to SLS and is not seen in other forms of neurocutaneous diseases [19].

Once SLS was considered to be due to an inborn error of metabolism, several studies established a dietetic therapy for SLS patients, aiming at the primary biochemical defect to block the exogenous admission of toxic substances (long-chain fatty alcohol) [8, 22]. Unfortunately many of these studies had only partial or no success at all. This may be attributed to the heterogeneity of genetic mutation or to the fact that the diet was recommended after the children had reached a certain age (the youngest patient started it when he was 5 months old) [8, 22].

Recently Willemsen *et al.* [23] demonstrated the role of FALDH in the leukotrienes metabolism through the degradation of leukotriene B4 (LTB4). They are synthesized from arachidonic acid via the 5-lipoxygenase pathway and are proinflammatory mediators. Elevated concentrations of the highly active metabolites LTB4 could contribute to the pathogenesis of SLS [23-25]. Analyses of urinary LTB4 metabolites offer a new and non invasive diagnostic tool for SLS [23-25]. Moreover, the discovery of the role of

leukotriene B4 in SLS symptoms opened the way to the development of a new therapeutic strategy, *i.e.*, 5-lipoxygenase inhibition. Willemsen *et al.* [24] treated one patient with zileuton, a medicine previously used in asthma, that blocks the synthesis of LTB4 by inhibiting 5-lipoxygenase, with slight beneficial effects, such as a decrease of pruritus. However, the pathophysiological significance of LTB4 in SLS is not well established. Its concentration is also elevated in patients with other neurological diseases, as meningitis and toxoplasmic encephalitis [23].

Some patients were treated with acitretin; ichthyosis and pruritus were markedly improved. Retinoids exert their effects on gene expression in the nucleus via cellular retinoic acid receptors. Patients with ichthyosis lamellar treated with acitretin had their clinical improvement associated with an increase in the expression of involucrin, the major component of the cornified envelope cell. Further studies at tissue level are needed to improve therapeutic options [8, 26, 27].

In patients 1 and 2 cutaneous features were improved, especially the pruritus that was the major problem for their mother. However, favorable changes were observed in neurologic symptoms in patient 2 after one year of dietary manipulation. At this moment, she seems to be more receptive to environmental contact and exhibits an improved corporal posture. However dietary treatment was started too late, at five years old for patient 1 and three years old for patient 2, when there was already a severe neurologic impairment. We hope to have some therapeutic success with patient 3, as he has had dietary counseling from birth. His neuropsychomotor development is normal to date, as is his skin, which, although dry, does not present obvious ichthyosis. It is necessary to remember that a high proportion of the fatty alcohols in the human body is not ingested, but rather produced by endogenous lipogenesis. Furthermore, the severity of neurologic symptoms shows considerable variation [11]. Thus, the beneficial effect of the dietary treatment cannot be assured even for the youngest patient.

Early diagnosis of SLS based on specific findings offers possibilities of developing the earliest therapeutic approaches and the dietary therapy proposed should be tested in more patients, before a negative conclusion be assumed. The precise relationship between the FALDH defect and clinical symptoms is not clear and little is known about the effects of fatty alcohol accumulation in skin and CNS. ■

Article accepted on 8/1/02

#### Acknowledgements

We thank Dr. W.B. Rizzo (Medical College of Virginia, USA) for performing the assays for enzyme activities (Fatty Aldehyde Dehydrogenase- FALDH) in our two patients.

## References

1. Heijer A, Reed WB. Sjögren-Larsson syndrome: congenital ichthyosis, spastic paralysis and oligophrenia. *Arch Dermatol* 1965; 92: 545-52.
2. Iselius L, Jagell S. Sjögren-Larsson syndrome in Sweden: Distribution of the gene. *Clin Genet* 1989; 35: 272-5.
3. Selmanowitz VI, Porter MJ. The Sjögren-Larsson syndrome. *Am J Med* 1967; 42: 412-22.
4. Lacour M. Update on Sjögren-Larsson syndrome. *Dermatology* 1996; 193: 77-82.
5. Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet* 1996; 12: 52-7.
6. Guilleminault C, Harpey JP, Lafourcade J. Sjögren-Larsson syndrome: report of two cases in twins. *Neurology* 1973; 23: 367-73.
7. Fivenson DP, Lucky AW, Iannoccone S. Sjögren-Larsson syndrome associated with the dandy-walker malformation: report of a case. *Pediatr Dermatol* 1989; 6: 312-5.
8. Taube B, Billeaud C, Labrèze C, Entressangles B, Fontan D, Taieb A. Sjögren-Larsson syndrome: early diagnosis, dietary management and biochemical studies in two Cases. *Dermatology* 1999; 198: 340-5.
9. Rizzo W, Dammann A, Craft D. A Sjögren-Larsson syndrome: impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol: nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest* 1988; 81: 738-44.
10. Hernell O, Holmgren G, Jagell SF, Johnson SB, Holman RT. Suspected faulty essential fatty acid metabolism in Sjögren-Larsson syndrome. *Pediatr Res* 1982; 16: 45-9.
11. Willemsen MAA, Ijlst L, Steijlen PM, Rottevel JJ, Jong JGN, Domburg PHMF, Mayatepek E, Gabreels FJM, Wanders RJA. Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjögren-Larsson syndrome. *Brain* 2001; 124: 1426-37.
12. Levisohn D, Dintiman B, Rizzo W. Sjögren-Larsson syndrome: case report. *Pediatr Dermatol* 1991; 8: 3217-20.
13. Bonafé JL, Peyraga C, Lafitte JM, Salvayre R, Rochiccioli P. Le syndrome de Sjögren-Larsson: à propos d'un cas. *Ann Dermatol Venerol* 1987; 114: 947-55.
14. Van Dambur PH, Willemsen MA, Rottevel JJ, de Jong JG, Thijsen HO, Heerschap A, Cruysberg JR, Wanders RJ, Gabreels FJ, Steijlen PM. Sjögren-Larsson syndrome: clinical and MRI/MRS findings in FALDH-deficient patients. *Neurology* 1999; 52: 1307-8.
15. Ito M, Oguro K, Sato Y. Ultrastructural study of the skin Sjögren-Larsson syndrome. *Dermatol Res* 1991; 283: 141-8.
16. Kousseff BG, Maatsuoka LY, Stenn KS, Hobbins JC, Mahoney MJ, Hashimoto K. Prenatal diagnosis of Sjögren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 1982; 101: 998-1001.
17. Yamaguchi K, Handa T. Sjögren-Larsson syndrome: postmortem brain abnormalities. *Pediatr Neurol* 1998; 19: 399.
18. Koone M, Rizzo W, Elias P, Williams M, Lighthner V, Pinnel S. Ichthyosis, mental retardation, and asymptomatic spasticity: a new neurocutaneous syndrome with normal Fatty Alcohol: NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase activity. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1484-90.
19. Kawakami T, Saito R, Fujikawa Y, Shinomiya N, Yamaguchi K, Yamaguchi Y, Aoki T, Kobayashi T. Incomplete Sjögren-Larsson syndrome in two Japanese siblings. *Dermatology* 1999; 198: 93-6.
20. Judge M, Lake B, Smith V, Besley G, Harper J. Depletion of alcohol (hexanol) dehydrogenase activity in the epidermis and jejunal mucosa in Sjögren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 632-4.
21. Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA, Black SH, Tilton AH, Africk D, Chaves-Carballo, Holmgren G, Jagell S. Sjögren-Larsson syndrome: inherited defect in the fatty alcohol cycle. *J Pediatr* 1989; 115: 228-34.
22. Maaswinkel-Mooij, Brouwer O, Rizzo W. Unsuccessful dietary treatment of Sjögren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 1994; 124: 748-50.
23. Willemsen MAA, Rottevel JJ, Jong JGN, Wanders RJA, Ijlst L, Hoffmann GFM, Mayatepek E. Defective metabolism of leukotriene B4 in the Sjögren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci* 2001; 124: 1426-37.
24. Willemsen MAA, Rottevel JJ, Steijlen PM, Heerschap A, Mayatepek E. 5-Lipoxygenase inhibition: a new treatment strategy for Sjögren-Larsson syndrome. *Neuropediatrics* 2000; 31: 1-3.
25. Willemsen MAA, Jong JGN, Domburg PHM, Rottevel JJ, Wanders RJA, Ijlst L, Mayatepek E. *J Pediatr* 2000; 136: 258-60.
26. Pena Penabaz C, de Unamuno P, Garcia Silva J, Ludena MD, Gonzalez Sarmiento R, Perez Arellano JL. Altered expression of immunoreactive involucrin in lamellar ichthyosis. *Eur J Dermatol* 1999; 9: 197-201.
27. Traupe H. The ichthyoses: a guide to Clinical diagnosis, genetic counselling and therapy. Berlin, Springer, 1989.

**Apêndice 2** - Auada MP, Puzzi MB, Cintra ML, Steiner CE, Alexandrino F, Sartorato EL, Aguiar TS, Azulay RD, Carney G, Rizzo WB. Sjogren-Larsson syndrome in Brazil is caused by a common c.1108-1G>C splice-site mutation in the ALDH3A2 gene. *Br J Dermatol* 2006; 154(4):770-3.

GENE CORNER

DOI 10.1111/J.1365-2133.2006.07135.x

## Sjögren–Larsson syndrome in Brazil is caused by a common c.1108-1G → C splice-site mutation in the ALDH3A2 gene

M.P. Auada, M.B. Puzzi, M.L. Cintra,\* C.E. Steiner,† F. Alexandrino,‡ E.L. Sartorato,‡ T.S. Aguiar,§, R.D. Azulay,§ G. Carney¶ and W.B. Rizzo¶

Departments of Internal Medicine, \*Pathology and

†Medical Genetics, and

‡Center of Molecular Biology and Genetic Engineering, Medical School, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

§Department of Dermatology Santa Casa of Rio de Janeiro University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

¶Department of Pediatrics, University of Nebraska, Nebraska Medical Center, Omaha, NE, U.S.A.

### Summary

#### Correspondence

M.P. Auada.  
E-mail: mauada@terra.com.br

#### Accepted for publication

20 October 2005

#### Key words

fatty aldehyde dehydrogenase, ichthyosis, mutation, Sjögren–Larsson syndrome

#### Conflicts of interest

None declared.

Sjögren–Larsson syndrome (SLS; OMIM 270200) is an autosomal recessive disorder characterized by the presence of pruritic ichthyosis, mental retardation, spastic diplegia or tetraplegia, retinal perimacular 'glistening white dots' and photophobia.<sup>1</sup> SLS is caused by mutations in the ALDH3A2 gene, which codes for fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH), a microsomal enzyme that catalyses the oxidation of medium- and long-chain aliphatic aldehydes.<sup>2</sup> More than 70 mutations have been identified in this disease.<sup>3</sup> Most mutations are unique to each SLS family, but several common mutations have been reported among patients from Europe and the Middle East. In the first molecular genetic analysis of a cohort of patients with SLS from Brazil, we now report a common disease-causing ALDH3A2 mutation, delineate its associated phenotypic spectrum and describe a diagnostic screening test using restriction enzyme digestion.

#### Case and methods

Nine patients with SLS from three apparently unrelated Brazilian kindreds native to the south and southeastern part of the country were studied. Patients 1, 2 and 3 were previously reported<sup>4</sup> and were born to consanguineous parents; patients 4, 5 and 6 are sisters and patients 7 and 8 are their cousins. Patient 9 was also born to first cousins. Blood specimens, skin biopsies and clinical data were collected after obtaining informed consent and with approval by the Institutional Review Board.

Total genomic DNA was extracted from blood using standard phenol-chloroform methods. ALDH3A2 exons and their flanking sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced.<sup>2</sup> To detect the c.1108-1G → C mutation more conveniently, exon 8 was digested with DdeI according to the manufacturer's instructions and restriction products separated by agarose gel electrophoresis. ALDH3A2 haplotypes were determined using four intragenic single nucleotide polymorphisms as described.<sup>2</sup> FALDH enzyme activity was measured in cultured skin fibroblasts.<sup>5</sup>

#### Results and discussion

##### Biochemical and molecular characterization

All patients had <10% of normal FALDH enzyme activity in cultured skin fibroblasts (Table 1). Sequencing of the ALDH3A2 gene revealed a homozygous c.1108-1G → C mutation in intron 7 of all of the affected individuals. Their parents were heterozygous for the mutation, except for the parents of patient 9 who were not tested. The c.1108-1G → C mutation abolishes a DdeI restriction enzyme cut site in the wild-type gene. DdeI digestion of a 275-bp PCR product of exon 8 and its flanking intron 7 sequence yielded a 181-bp fragment from normal control subjects, but a 263-bp fragment from the patients with SLS (Fig. 1b). This constitutes a convenient screening test for the mutation. Haplotype analysis of the

© 2006 British Association of Dermatologists • British Journal of Dermatology 2006

|   |              |                |          |                   |                 |               |
|---|--------------|----------------|----------|-------------------|-----------------|---------------|
|  | <b>B J D</b> | <b>7 1 3 5</b> | <b>B</b> | Dispatch: 23.1.06 | Journal: BJD    | CE: Blackwell |
|   | Journal Name | Manuscript No. |          | Author Received:  | No. of pages: 4 | PE: Lakshmi   |

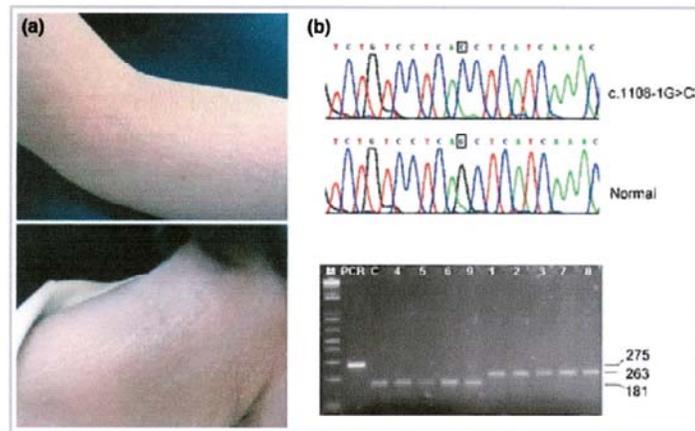
Table 1 Clinical, histological and enzymatic findings in the patients with Sjögren-Larsson syndrome

| Patient                           | 1                                | 2                                | 3                                    | 4                                | 5                                | 6                                | 7                                    | 8                                | 9                                |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Sex/age (years)                   | F/8                              | F/6                              | /4                                   | F/25                             | F/10                             | F/14                             | F/30                                 | M/28                             | M/21                             |
| Dermatological                    | Severe                           | Severe                           | Moderate                             | Moderate                         | Moderate                         | Moderate                         | Severe                               | Moderate                         | Moderate                         |
| Ichthyosis                        | Severe                           | Severe                           | Moderate                             | -                                | -                                | Focal                            | Focal                                | -                                | +                                |
| Pruritus                          | Severe                           | Severe                           | Moderate                             | -                                | -                                | -                                | -                                    | -                                | -                                |
| Neurological                      | Severe                           | Severe                           | Moderate                             | Severe                           | Moderate                         | Severe                           | Moderate                             | Severe                           | Moderate                         |
| Mental retardation                | Severe                           | Severe                           | Moderate                             | Severe                           | Moderate                         | Severe                           | Moderate                             | Severe                           | Moderate                         |
| Tendon reflexes                   | Prominent                        | Prominent                        | Prominent                            | Prominent                        | Prominent                        | Prominent                        | Prominent                            | Prominent                        | Prominent                        |
| Muscular tone                     | Increased                        | Increased                        | Increased                            | Increased                        | Increased                        | Increased                        | Increased                            | Increased                        | Increased                        |
| Spastic palsy                     | Diplegia, confined to wheelchair | Diplegia, confined to wheelchair | Paraparesis, ambulatory with support | Diplegia, confined to wheelchair | Diplegia, confined to wheelchair | Diplegia, confined to wheelchair | Paraparesis, ambulatory with support | Diplegia, confined to wheelchair | Diplegia, confined to wheelchair |
| Ophthalmological                  | Not tested                       | Not tested                       | Not tested                           | Not tested                       | Not tested                       | Not tested                       | Reduced                              | Reduced                          | Normal                           |
| Visual acuity                     | -                                | -                                | -                                    | +                                | -                                | -                                | -                                    | -                                | +                                |
| Gilbreting dots                   | -                                | -                                | -                                    | +                                | +                                | +                                | +                                    | +                                | +                                |
| Photophobia                       | Abdomen                          | Abdomen                          | Abdomen                              | Lower back                       | Lower back                       | Lower back                       | Arm                                  | Arm                              | Arm                              |
| Histological                      | +                                | +                                | +                                    | +, focal                         | +, compact                       | +, loose                         | +                                    | +                                | +                                |
| Biopsy site                       | +                                | focal                            | +                                    | +, marked                        | +                                | +, focal                         | +, focal                             | +                                | +                                |
| Hyperkeratosis                    | +                                | +                                | +, focal                             | +, marked                        | +                                | +                                | +                                    | +                                | +                                |
| Acanthosis                        | +                                | +                                | +                                    | +                                | +                                | +                                | +                                    | +                                | +                                |
| Papillomatosis                    | 1.5                              | 1.5                              | 1.5                                  | 3.0                              | 1.5                              | 1.3                              | 4.0                                  | 4.0                              | Not tested                       |
| Cell layers in stratum granulosum | Hypersalivation                  | Hypersalivation                  | 1%                                   | 3%                               | 8%                               | 3%                               | Hypothyroidism                       | Hypothyroidism                   | 9%                               |
| Other clinical features           | Not tested                       | 2%                               |                                      |                                  |                                  |                                  | <1%                                  | <1%                              |                                  |
| FALDH activity <sup>a</sup>       |                                  |                                  |                                      |                                  |                                  |                                  |                                      |                                  |                                  |

+, present; -, absent.

<sup>a</sup>Fatty acid dehydrogenase (FALDH) activity measured in cultured fibroblasts is expressed as a percentage of mean normal activity (8850 pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein).

COLOUR FIG.



**Fig 1.** Mutation detection and appearance of the ichthyosis in the Brazilian patients with Sjögren–Larsson syndrome. (a) The antecubital region of the arm (patient 5) shows thickened skin markings, and a posterior view of the neck (patient 4) shows a marked yellow-brown lichenified hyperkeratosis. (b) The c.1108-1G → C mutation abolishes a DdeI restriction enzyme cut site in the wild-type gene. Digestion of a 275-bp DNA fragment of intron 7/exon 8 with DdeI restriction enzyme demonstrates the c.1108-1G → C mutation. The control DNA was cut into three fragments (181 + 82 + 12 bp), whereas the mutation eliminates a DdeI cut site, resulting in formation of 263-bp and 12-bp fragments. The smaller DNA fragments have run off the gel and are not visualized. Lane M, molecular weight markers; lane PCR, undigested DNA; lanes C, 4, 5, 6 and 9, control DNAs digested with DdeI; lanes 1, 2, 3, 7 and 8, digested DNAs from patients 1, 2, 3, 7 and 8, respectively. Numbers to the right of the gel indicate the size of the DNA fragments in bp.

ALDH3A2 gene showed that patients from each family were homozygous for haplotype 1 (see Rizzo *et al.*<sup>2</sup>).

The c.1108-1G → C mutation alters the splice acceptor site at the junction of intron 7 and exon 8. Like many exons, exon 8 does not end between codons, but rather ends with part of a codon, which is completed when exon 8 is spliced to exon 9. Consequently, skipping of exon 8 results in a frameshift of all subsequent codons in exon 9 and 10. The results of this mutation, as previously reported,<sup>2</sup> are two abnormal mRNA transcripts. One transcript is missing exon 8 and is predicted to cause a deletion of amino acids 370–403 with frameshift and premature termination of translation, whereas the other transcript is missing exons 8 and 9, which leads to deletion of amino acids 370–481.<sup>2</sup> Both abnormal proteins should be devoid of catalytic activity, because they are missing amino acid residues that are critical for forming the catalytic domain and binding of the protein to the microsomal membrane. The small amount of residual FALDH activity in our patients with SLS is probably due to the presence of another related aldehyde dehydrogenase enzyme.<sup>6</sup>

In addition to our Brazilian patients, a 28-year-old SLS proband from Spain has been reported with the c.1108-1G → C mutation, also associated with haplotype 1.<sup>7</sup> As the Brazilian patients have the same intragenic ALDH3A2 haplotype, it is tempting to speculate that a common ancestor carrying the c.1108-1G → C allele migrated to Brazil from the Iberian Peninsula of Europe in the 16th century and that subsequent inbreeding, as seen in each of our three families, resulted in the appearance of homozygous patients with SLS.

### Clinical and histological features

The relationship between the ALDH3A2 genotype and the clinical phenotype of SLS has been difficult to establish, because most mutations are unique for each family and typically affect only one or two siblings. Except for the Swedish patients with SLS who are homozygous for c.943C → T, no studies have examined a large group of patients with the same genotype.<sup>8</sup> Our Brazilian patients therefore provide a unique opportunity to define the phenotypic variation associated with c.1108-1G → C.

The clinical and histological data on the nine patients with SLS are summarized in Table 1. In general, the patients exhibited a moderate-to-severe form of SLS with respect to mental retardation, spastic diplegia and ichthyosis. Within this phenotypic context, patients varied, even within a family, in the presence of pruritus, thickness of the granular layer, retinal glistening white dots and photophobia. All of our patients had moderate-to-severe ichthyosis with marked yellow-brown and lichenified hyperkeratosis (Fig. 1a). Pruritus was present only in six patients. Histologically, the cutaneous pathology revealed variation in the nature of the hyperkeratosis (focal, compact or loose) and the thickness of the granular layer. Macular glistening white dots, which are a pathognomonic feature of SLS,<sup>1</sup> were seen in only two of our patients. Four of six patients who had photophobia did not have glistening dots, suggesting that more subtle macular changes are responsible for the photophobia in SLS.

In summary, our Brazilian patients with SLS possess a common mutation that can be easily detected by DdeI digestion.

The patients exhibit a strikingly similar moderate-to-severe neurocutaneous phenotype in which variation in cutaneous and ocular symptoms may be ascribed to unknown genetic and/or environmental factors.

### Acknowledgments

This research was supported by grant AR44552 from the National Institutes of Health (U.S.A.) and a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil).

### References

- 1 Rizzo WB. Sjögren–Larsson syndrome: fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. (Scriver CR, Beckman K, Small GM, Valle D, eds). Vol. 2. New York: McGraw-Hill, 2001; 2239–58.
- 2 Rizzo WB, Carney G, Lin Z. The molecular basis of Sjögren–Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet* 1999; **65**:1547–60.
- 3 Rizzo WB, Carney G. Sjögren–Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). *Hum Mutat* 2005, in press.
- 4 Auada MP, Taube MB, Collares EF *et al.* Sjögren–Larsson syndrome: biochemical defects and follow up in three cases. *Eur J Dermatol* 2002; **12**:263–6.
- 5 Kelson TL, Secor M, Rizzo WB. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1335**:99–110.
- 6 De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ *et al.* Sjögren–Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet* 1996; **12**:52–7.
- 7 Carney G, Wei S, Rizzo WB. Sjögren–Larsson syndrome: seven novel mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene ALDH3A2. *Hum Mutat* 2004; **24**:186.
- 8 De Laurenzi V, Rogers GR, Tarcsa E *et al.* Sjögren–Larsson syndrome is caused by a common mutation in northern European and Swedish patients. *J Invest Dermatol* 1997; **109**:79–83.

## Apêndice 3 - Epidermal texture analysis in Sjögren-Larsson syndrome, a ser publicado:

"Analytical and Quantitative Cytology and Histology"

# Texture Analysis of the Epidermis Based on Fast Fourier Transformation in Sjögren-Larsson Syndrome

Mariam P. Auada, Randall L. Adam, Neucimar J. Leite, Maria B. Puzzi, Maria L. Cintra, William B. Rizzo, and Konradin Metzke

**OBJECTIVE:** To investigate whether image analysis of routine hematoxylin-eosin (H-E) skin sections using fast Fourier transformation (FFT) could detect structural alterations in patients with Sjögren-Larsson syndrome (SLS) diagnosed by molecular biology.

**STUDY DESIGN:** Skin punch biopsies of 9 patients with SLS and 17 healthy volunteers were obtained. Digital images of routine histologic sections were taken, and their gray scale luminance was analyzed by FFT. The inertia values were determined for different ranges of the spatial frequencies in the vertical and horizontal direction. To get an estimation of anisotropy, we calculated the resultant vector of the designated frequency ranges.

**RESULTS:** In the prickle cell layer, SLS patients showed more intense amplitudes in spatial structures with periods between 1.2 and 3.6  $\mu$ m in the vertical direction, which correlated in part with accentuated nuclei and nucleoli and perinucleolar halos in the H&E sections. In a linear discriminant analysis, the variables derived from the FFT images correctly discriminated 84.6% of the patients. Texture features derived from the gray level co-

occurrence matrix were not able to separate the groups. **CONCLUSION:** Exploratory texture analysis by FFT was able to detect discrete alterations in the prickle cell layer in routine light microscopy slides of SLS patients. The structural changes identified by FFT may be related to abnormal cellular components associated with aberrant lipid metabolism. (Anal Quant Cytol Histol 2006;28:000-000)

### Keywords:

Sjögren-Larsson syndrome (SLS; OMIM#270200) is a rare autosomal recessively inherited form of ichthyosis associated with mental retardation, spastic diplegia, speech defects and ophthalmologic abnormalities.<sup>1</sup> The ichthyosis usually has a congenital onset and precedes the appearance of the neurologic symptoms. Patients typically exhibit generalized hyperkeratosis, which is accentuated on the flexures, neck and the lower abdomen. SLS is an inborn error of lipid metabolism caused by mu-

From the Departments of Internal Medicine and Pathology, Faculty of Medicine, State University of Campinas; Institute of Computing, State University of Campinas, Campinas, Brazil; and the Department of Pediatrics, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, U.S.A.

\_\_\_ Auada is \_\_\_\_\_, Department of Internal Medicine, State University of Campinas.

\_\_\_ Adam is \_\_\_\_\_, Department of Pathology, State University of Campinas.

\_\_\_ Leite is \_\_\_\_\_, Institute of Computing, State University of Campinas.

\_\_\_ Puzzi is \_\_\_\_\_, Department of Internal Medicine, State University of Campinas.

\_\_\_ Cintra is \_\_\_\_\_, Department of Pathology, State University of Campinas.

\_\_\_ Rizzo is \_\_\_\_\_, Department of Pediatrics, University of Nebraska Medical Center.

\_\_\_ Metzke is \_\_\_\_\_, Department of Pathology, State University of Campinas.

Address correspondence to:

*Financial Disclosure:* The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article.

0884-6812/06/2800-0000/\$15.00/0 © Science Printers and Publishers, Inc.

Analytical and Quantitative Cytology and Histology®

1

tations in the *ALDH3A2* gene that codes for the microsomal enzyme fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH).<sup>2,3</sup> This enzyme catalyzes the oxidation of medium- and long-chain aliphatic aldehydes to fatty acids.<sup>4</sup> Patients with SLS have FALDH deficiency in a variety of tissues, including cultured skin fibroblasts, cultured keratinocytes, leukocytes, intestinal mucosa and skin biopsies.<sup>2,4-7</sup> The pathogenesis of the ichthyosis in SLS is not yet understood, but it is thought to be due to the accumulation of fatty aldehydes and their precursor lipids, including fatty alcohol.<sup>1</sup> Histologic examination of the epidermis in SLS shows hyperkeratosis, papillomatosis and acanthosis. The stratum corneum may have a basket-weave appearance, and the granular layer may be slightly thickened.<sup>8-10</sup> On light microscopy examination, clearly visible epidermal abnormalities are seen in the stratum corneum and to a much lesser extent in the stratum granulosum. Cytologic abnormalities in the prickle cell layer have been seen only by electron microscopy, but not by light microscopy.

Modern methods for texture analysis of tissues can reveal discrete alterations not visible to the human eye.<sup>11-21</sup> One of these texture analysis techniques is fast Fourier transformation (FFT). The French scientist J. B. Fourier mathematically described the harmonic nature of waves and demonstrated that any "irregular" continuous function could be interpreted as a sum of sine and cosine waves.<sup>22</sup> Fourier transformation has been widely used for the analysis and treatment of communication signals, but can also be applied to the description of images, because regularly organized relationships between picture elements may be interpreted as cyclic, harmonic events. This method can calculate orientation, periodicity and spacing based on architecture of collagen bundles and has been successfully applied in dermatopathology as an objective and reproducible method.<sup>11,13-16,19,21</sup>

The aim of this study was to analyze whether FFT could be used in an exploratory way to detect alterations in the prickle cell layer of routine light microscopic tissue sections.

### Materials and Methods

#### Patients

For this prospective study, 5-mm skin punch biopsies were collected from 9 patients diagnosed with SLS (6 biopsies from the abdomen and 3 from the forearm). As a control group, biopsies were obtained from the same topographic sites from 17 vol-

unteers of similar age during routine surgery for skin tumors. Skin biopsies were also obtained for establishing fibroblast cultures using standard methods. The study was approved by the institution's ethics committee, and all subjects or their legal representatives gave their written informed consent.

SLS was confirmed by molecular biologic analysis. Total genomic DNA was extracted from 10 mL of peripheral blood using standard phenol-chloroform methods. *ALDH3A2* exons and their flanking DNA sequences were amplified by PCR using primers as described.<sup>3</sup> The DNA sequences were determined by automated sequencing and compared to that of the reference DNA sequence of the *ALDH3A2* gene (GenBank accession number NM\_000382). The mutation was described using cDNA nomenclature. FALDH enzyme activity was measured in cultured skin fibroblasts.<sup>4</sup>

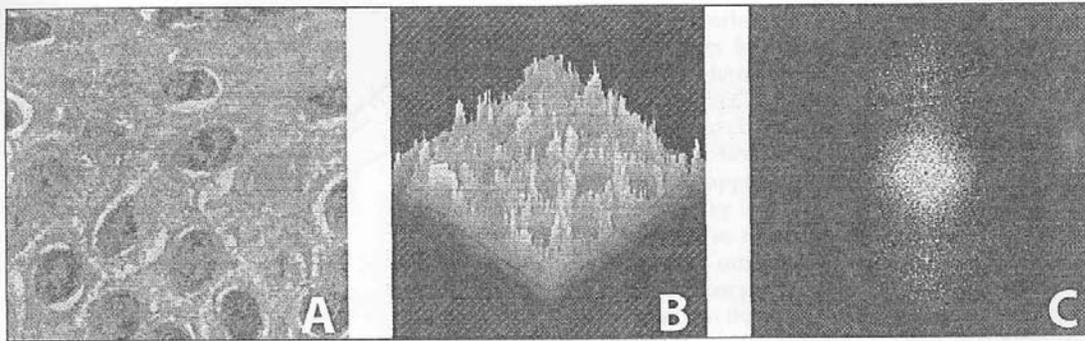
Fragments of the skin biopsy samples were routinely formaldehyde-fixed and paraffin-embedded, and 5- $\mu$ m sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E).

#### Image Acquisition

From each subject, 10 horizontally orientated bit-map images (size 48 $\times$ 48  $\mu$ m, equivalent to 480 $\times$ 480 pixels) were randomly taken of the stratum spinosum layer using the Kontron Zeiss KS300 system (0.1  $\mu$ m/pixel spatial resolution; 1.25 numerical aperture; 100 $\times$  oil immersion objective). Only the prickle cell layer of suprapapillary epidermis was captured with the best focus, that is, when the nuclear outlines of the keratinocytes are clearly distinguishable. The analysis was done by one examiner (MPA) blinded to the diagnosis. The images were converted to grayscale format with levels of luminance ranging between 0 (absence of light) and 255 (very bright), using a human-perceptually homogeneous scale of luminance.<sup>20</sup> To compensate for variations of the staining procedure, the histograms of all images were submitted to a normalization process, reaching a mean luminance of 127 and SD of 30 gray values.

#### Fast Fourier Transformation

We created a pseudo-three-dimensional "landscape-like" representation using the gray level (luminance) of each pixel (picture element) as the height of a z-axis (Figure 1A and B), which is now interpreted as the result of many different overlapping harmonic functions. Applying the FFT algo-



**Figure 1** Original image of normal prickle cell layer (A), in the pseudo-3-dimensional representation (B) and as spectral representation after FFT (C), which shows a huge number of pairs of points, representing all of the harmonic waves composing the original image (A).

rithm, we transformed each “hidden” wave of the original picture into a pair of picture elements (pixels) in the transformed (FFT) image, point-symmetric to the center of the FFT image. The direction of the harmonic function represented by the two picture elements is the line between the points, their distance to the center of the transformed image is the spatial frequency and their luminance is proportional to the amplitude of the harmonic wave, that is, the difference between maximal and minimal gray values of the harmonic function. Thus, each point-symmetric pair of pixels in the transformed image represents a harmonic function in the original image. The set of all pixel pairs of the FFT image represents the sum of the corresponding harmonic functions in the original picture. A mean filter smoothing was applied to avoid artifacts (aliasing effects) in the FFT image caused by the edge borders of the original image.<sup>23,24</sup> This allowed deriving from the FFT image precise information about these harmonic components (Figure 1C).

To obtain useful information we calculated the inertia values, which are equivalent to the amplitudes of the harmonic waves, which built up the microscopic image. Higher amplitudes are equivalent to a more contrasted, repetitive pattern in the microscopic image of the epidermis.

Because the epidermal architecture contains predominantly horizontally and vertically arranged cells, we analyzed the amplitude values in horizontal and vertical sectors in 30-degree angles. Each sector was subdivided into 6 frequency ranges, from zero to  $5 \mu\text{m}^{-1}$  (or spatial periods between in-

finity and  $0.2 \mu\text{m}$ , respectively), which were compared between control patients and patients with SLS by the nonpaired Student's *t* test ( $p = 0.05$ ). Correlations were evaluated by the Pearson test.

To get an estimation of anisotropy, that is, an estimate of the variation of the amplitude of waves along axes in different directions, we calculated the resultant vector of the designated frequency ranges (Figure 2).

The length of resultant vector is given by:

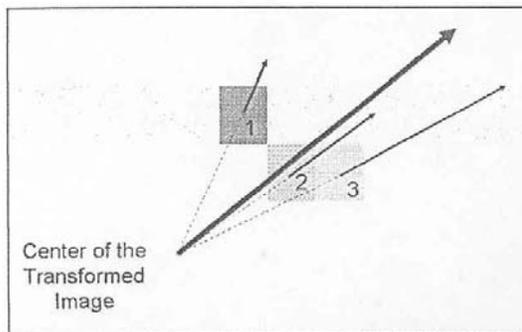
$$R = \sqrt{(\sum_i g_i \sin 2\alpha_i)^2 + (\sum_i g_i \cos 2\alpha_i)^2}$$

where *i* indicates the *i*-th vector, which represents a pixel in the right half of FFT image; the angle  $\alpha_i$  is the direction of each vector defined by the line between the center of the FFT image and the pixel  $(u_i, v_i)$  (Figure 2), equivalent to  $\arctan(v_i/u_i)$ ;  $g_i$  is the gray value of the pixel in the FFT, defined by:

$$g_i = \sqrt{(u_i^2 + v_i^2)(R(u_i, v_i)^2 + I(u_i, v_i)^2)} = d \cdot |F(u_i, v_i)|$$

which indicates the amplitude (in gray values) of the harmonic function at  $(u_i, v_i)$  in the FFT image;  $R(u_i, v_i)$  and  $I(u_i, v_i)$  represent, respectively, the real and imaginary parts of the complex value at pixel  $(u_i, v_i)$  in the Fourier-transformed representation; *d* is the distance between the pixel  $(u_i, v_i)$  to the center of the FFT image.

The size of the resultant vector of a certain frequency range (ring) in the FFT image is a measure of the anisotropy. This value is low if harmonic waves of equal amplitude would be represented in



**Figure 2** Resultant vector calculated in a certain frequency range (1, 2 and 3 represent gray values of three pixels of the FFT image). The bold arrow is the resultant vector of these vectors.

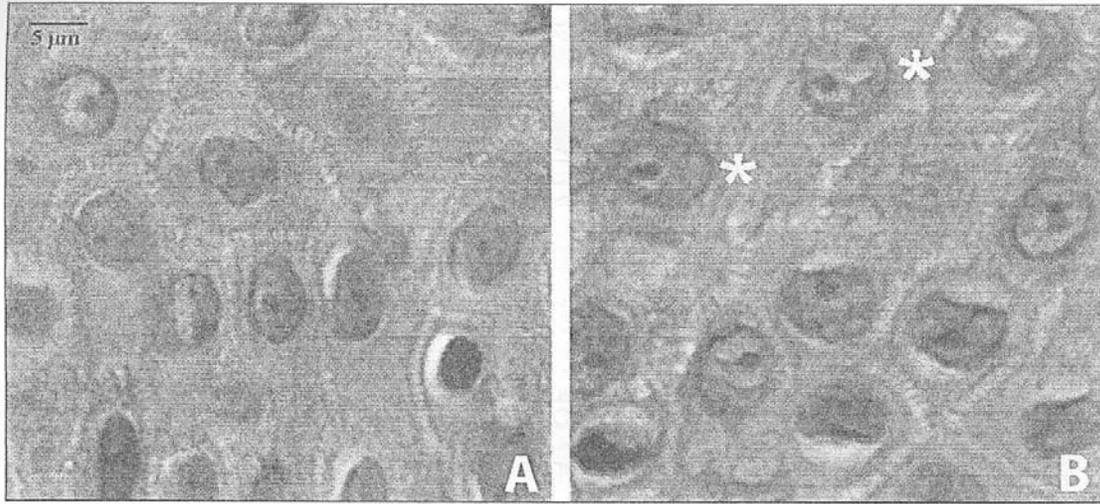
each direction of the original image, and high when there is predominance of a certain direction, for example several vectors in parallel. Furthermore, we

tested the discriminative power of the different texture variables by a linear discriminant analysis, where we determined the importance of each variable to "predict" the correct diagnosis. To obtain a more realistic classification matrix, the leave-one-out method (also referred to as the "jack-knife" procedure) was applied, whereby each subject is classified according to the remaining (n-1) cases. This procedure was regarded as the method of choice considering our relatively small sample sizes. When necessary, the logarithmic functions were performed on the variables to obtain normal distributions for the discriminant analysis.<sup>25-27</sup> SPSS and WINSTAT software programs were used. Finally, to investigate whether the elements of the image could influence the FFT-derived variables, the number of nuclei per image was counted. Furthermore the texture features of the gray values were analyzed. For this purpose the following variables derived from the gray value co-occurrence matrix were calculated according to Haralick et al<sup>28</sup>: angu-

**Table 1** Patient Data

|                   | Age | Sex | Biopsy site | Resultant vector (region 6) | Predicted diagnosis |
|-------------------|-----|-----|-------------|-----------------------------|---------------------|
| Patients with SLS |     |     |             |                             |                     |
| 1                 | 6   | F   | T           | 62.0                        | SLS                 |
| 2                 | 8   | F   | T           | 35.0                        | Normal              |
| 3                 | 14  | F   | T           | 199.7                       | SLS                 |
| 4                 | 25  | F   | T           | 50.8                        | SLS                 |
| 5                 | 27  | M   | F           | 45.2                        | SLS                 |
| 6                 | 29  | F   | F           | 59.3                        | SLS                 |
| 7                 | 10  | F   | T           | 46.8                        | SLS                 |
| 8                 | 4   | M   | T           | 48.2                        | SLS                 |
| 9                 | 4   | M   | F           | 30.3                        | Normal              |
| Controls          |     |     |             |                             |                     |
| 10                | 10  | F   | T           | 30.8                        | Normal              |
| 11                | 21  | F   | F           | 18.4                        | Normal              |
| 12                | 10  | F   | T           | 45.0                        | SLS                 |
| 13                | 25  | F   | T           | 30.7                        | Normal              |
| 14                | 12  | F   | T           | 36.3                        | Normal              |
| 15                | 13  | F   | T           | 21.6                        | Normal              |
| 16                | 17  | M   | T           | 25.6                        | Normal              |
| 17                | 40  | F   | T           | 33.9                        | Normal              |
| 18                | 36  | M   | F           | 38.4                        | Normal              |
| 19                | 17  | M   | T           | 34.1                        | Normal              |
| 20                | 11  | M   | T           | 26.2                        | Normal              |
| 21                | 12  | F   | T           | 31.5                        | Normal              |
| 22                | 9   | F   | T           | 26.8                        | Normal              |
| 23                | 10  | F   | T           | 38.60                       | Normal              |
| 24                | 25  | M   | T           | 34.2                        | Normal              |
| 25                | 9   | M   | F           | 54.3                        | SLS                 |
| 26                | 11  | M   | F           | 29.7                        | Normal              |

SLS group: patients 1-9; control group: patients 10-26; age in years; anatomical site of biopsy: T, trunk; F, forearm. The length of the resultant vector of region 6 (0.6-0.72  $\mu\text{m}$ ) in arbitrary units. The last column with the result of the discriminant analysis after jackknife procedure based on the resultant vector of region 6.

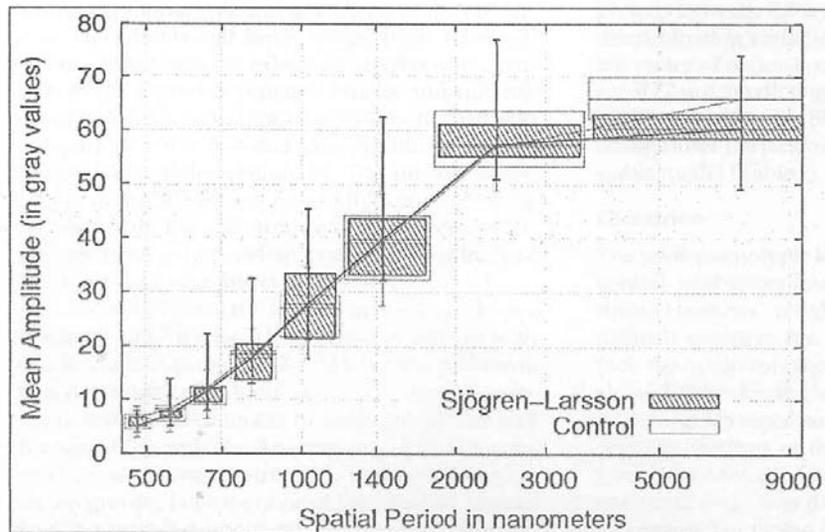


**Figure 3** Light microscopic examination of the prickle cell layer of a control person (A) and a patient with SLS (B). Note the clear halos around the nucleoli (\*), contrasting sharply with the dark nucleoli in (B).

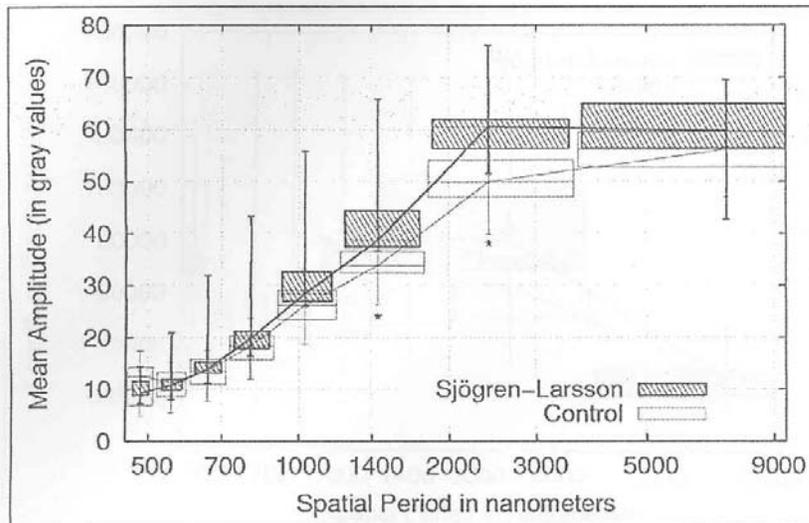
lar second moment, inertia, local homogeneity, entropy, contrast, inverse difference moment, diagonal moment, second diagonal moment, mean, standard deviation, coefficient of variation, sum average, cluster shade, cluster prominence and product moment.

**Results**

The 9 patients with SLS (4 male and 5 female) were from 3 families. Their mean age was 14 years (range, 4–30). The control group comprised 17 healthy subjects (7 males and 10 females), with a mean age of 16 years (range, 9–40) (Table I).



**Figure 4** Harmonic waves in the horizontal direction. No significant differences between controls and patients with SLS.



**Figure 5** Harmonic waves in the vertical direction. Higher amplitudes in patients with SLS in frequency ranges of 1.3–3.6  $\mu\text{m}$ . \*Significant differences,  $p < 0.05$ .

Diagnosis of SLS was confirmed by enzymatic and genetic means. All patients with SLS had  $< 10\%$  of normal FALDH enzyme activity in cultured skin fibroblasts. Sequencing of the *ALDH3A2* gene revealed a homozygous c.1108-1G>C mutation in intron 7 of all of the affected individuals.

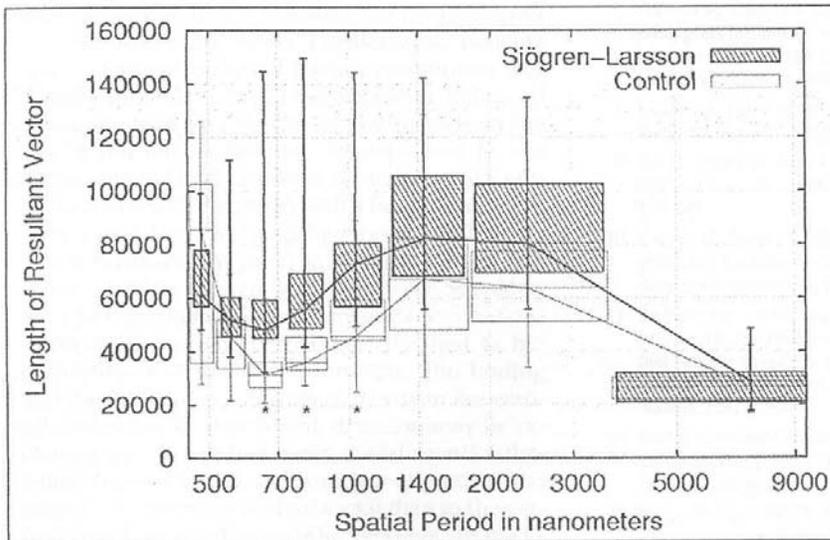
All patients with SLS showed generalized ichthyosis with marked yellow-brown lichenified hyperkeratosis around the neck and the joints. Histologic examination of the skin showed hyperkeratosis, papillomatosis and acanthosis of the epidermis. The prickle cell layer varied from 1.5–4 cell layers. Only 3 patients exhibited a basket-wave pattern in the stratum corneum. Nuclei and nucleoli appeared larger in the spinous layer of normal skin compared to SLS skin and also exhibited frequent perinucleolar halos (Figure 3). The nuclear membranes in the SLS cells appeared thickened. Striking differences in the architecture of the lower epidermal layers were not evident, but some smoothing of the rete ridges was found in SLS skin.

In control patients the mean number of nuclei per image was 18.7 (range, 14.5–23) and in patients with SLS it was 21.1 (range, 16.2–30.6), but the difference was not statistically significant. There was no correlation between the number of nuclei per picture and the age of the patients. Analyses based on the gray-level co-occurrence matrix did not discriminate between groups, because none of the Haralick texture features revealed significant differences. When ex-

amining the Fourier-derived variables the direction showed to be important. Texture analysis did not reveal statistically significant differences between the frequency regions in the horizontal direction (Figure 4). Yet significant differences were found in the vertical direction, corresponding to rings 2 to 3, or, in other words, spatial periods (wave length) of 1.2–3.6  $\mu\text{m}$  (Figure 5). In the vertical direction there were also significant differences between the resultant vectors in the regions 4–6, equivalent to spatial periods between 0.6 and 1.2  $\mu\text{m}$  (Figure 6). The best discriminating variable was the length of the resultant vector of region 6, equivalent to spatial waves of 0.6–0.72  $\mu\text{m}$ , predicting the correct diagnosis in 84% of the patients with SLS. Since this result did not change after the jackknife procedure, it represents a stable model (Table 1).

#### Discussion

The wide phenotypic heterogeneity within the congenital ichthyoses and the lack of diagnostically distinct features on light microscopy of the skin is a difficult problem for the surgical pathologist. In SLS, the epidermis shows acanthosis, papillomatosis and hyperkeratosis, sometimes with a basket-weave appearance to the stratum corneum and slight thickening of the granular layer.<sup>8–10</sup> Therefore, the histologic features of SLS are not pathognomonic and other diagnostic approaches such as biochemical or molecular genetic studies are usual-



**Figure 6** Resultant vectors of SLS vectors are larger at spatial periods between 0.6 and 1.2  $\mu\text{m}$ . \*Significant differences,  $p < 0.05$ .

ly necessary. In this context, quantitative assessment of routine histologic slides may be useful. Since morphologic alterations reflect physiologic changes in cell functions, quantitative histologic analysis could be helpful for the diagnosis and understanding of the pathophysiologic mechanisms.

Quantitative analysis of epithelia is usually performed by isolated analysis of its cellular elements.<sup>29-36</sup> Moreover the cellular elements must be isolated by segmentation, which is not yet a standardized procedure<sup>37-42</sup> and thus modifies the final results. In contrast, we were interested in analyzing changes of the whole tissue architecture without previous selection of elements. This is possible by extracting features of the gray-level co-occurrence matrix by fractal or Fourier analysis.<sup>13,43</sup> Fourier analysis may be used for the characterization of nuclear shape,<sup>44</sup> and in dermatopathology it has shown to be a precise and reliable method for the evaluation of the collagen texture.<sup>11,14</sup>

In our study we showed its usefulness for the detection of subtle architectural differences in the prickle cell layer of patients with SLS compared with normal skin. None of the Haralick texture features was able to separate the two entities, but with only one Fourier-derived variable we could discriminate in 84.6% between patients and controls. A major question to address is the morphologic equivalent of the differences detected by the FFT.

The normal epidermis has an anisotropic, highly organized structure of horizontal layers parallel to the basal membrane, thus permitting an analysis by FFT. During epidermal differentiation, cell migration mainly occurs in the vertical direction in the epithelium. The cell architecture is highly organized, predominantly in the vertical and horizontal layers, which was the main reason for our FFT study in these two directions.

Electron microscopy studies of the skin in patients with SLS revealed the presence of enlarged and misshapen lamellar bodies in the cytoplasm of keratinocytes in the granular and prickle cell layers.<sup>7,9,45</sup> In addition, abnormal lipid inclusions were observed, probably derived from intracellular organelles. Our study revealed more accentuated rhythmic structures in patients with SLS of a spatial wavelength of 1.2–3.6  $\mu\text{m}$  in the vertical direction but not in the horizontal direction. The amplitudes were larger in the SLS group, corresponding to greater nuclear and nucleolar volumes, higher numbers of nucleoli with perinucleolar halos and focal increase in nuclear membrane thickness of keratinocytes in these patients. Additional structural changes in subcellular organelles seen only with electron microscopy may also contribute to our FFT results.

Concomitantly, the structures were more anisotropic (spatial range, 0.6–1.2  $\mu\text{m}$ ). This may be due to the observed flattening of the epidermis in pa-

tients with SLS, which increases the parallelism of the cells and their nuclei. Furthermore, patients with SLS show thickened nuclear membranes and prominent nucleoli, with perinucleolar halos, all structures that enhance the spatial periods in the 1.2–3.6  $\mu\text{m}$  range. This may be explained by the higher rate of DNA synthesis occurring in SLS epidermis, which is associated with a faster production of the horny layer and a 3.5-fold increase in the rate of cell turnover compared to normal.<sup>45</sup> Thus, SLS and some other forms of ichthyosis, such as epidermolytic hyperkeratosis and congenital nonbullous ichthyosiform erythroderma, are classified as hyperproliferative forms of ichthyosis. The finding that the differences were detected only in the vertical, but not in the horizontal, direction may be explained by the fact that many nuclei reveal a flattened ellipsoid form and the nuclear alignment was more pronounced in the horizontal than in the vertical direction. In other words, keratinocyte nuclei are positioned more parallel to the basement membrane and do not grow as distinct columns in the epidermis.

In summary, texture analysis by FFT of the whole epidermis is an objective explorative method that detects discrete alterations in the prickle cell layer in routine light microscopy slides of patients with SLS.

### References

- Rizzo WB: Sjögren-Larsson syndrome: Fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *In* The Molecular & Metabolic Bases of Inherited Disease. Eighth edition. Edited by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, MD Valle. New York, McGraw-Hill, 2001, 2239
- Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA: Sjögren-Larsson syndrome: Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol:nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest* 1988; 81:738–744
- Rizzo WB, Carney G, Lin Z: The molecular basis of Sjögren-Larsson syndrome: Mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet* 1999;65:1547–1560
- Rizzo WB, Craft DA: Sjögren-Larsson syndrome: Deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase component of fatty alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase in cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991;88:1643–1648
- Willemsen MA, de Jong JC, van Domburg PH, Rotteveel JJ, Wanders RJ, Mayatepek E: Defective inactivation of leukotriene B<sub>4</sub> in patients with Sjögren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 2000;136:258–260
- Auada MP, Taube MBP, Collares EF, Tanaka AMU, Cintra ML: Sjögren-Larsson syndrome: Biochemical defects and follow up in three cases. *Eur J Dermatol* 2002;12:263–266
- Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H: Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in a Japanese family of Sjögren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 2004;123:1197–1199
- Hofer PA, Jagell S: Sjögren-Larsson syndrome: A dermatohistopathological study. *J Cutan Pathol* 1982;9:360–376
- Ito M, Oguro K, Sato Y: Ultrastructural study of the skin in Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 1991;283:141–148
- Lacour M, Mehta-Nikhar B, Atherton DJ, Harper JI: An appraisal of acitretin therapy in children with inherited disorders of keratinization. *Br J Dermatol* 1996;134:1023–1029
- de Vries HJC, Enomoto DNH, van Marle J, van Zuijlen PPM, Mekkes JR, Bos JD: Dermal organization in scleroderma: The fast Fourier transform and the laser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin. *Lab Invest* 2000;80:1281–1289
- Metze K, Souza Filho W, Adam RL, I Lorand-Metze: Analysis of the component “tree” as a new tool for analytical cellular pathology. *Anal Cell Pathol* 2001;22:64
- Metze K, Silva PVVT, Adam RL, Cintra ML, Leite NJ: Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. *Anal Cell Pathol* 2002;24:196
- van Zuijlen PPM, de Vries HJ, Lamme EN, Coppens JE, van Marle J, Kreis RW, Middelkoop E: Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *J Pathol* 2002;198:284–291
- Metze K, Adam RL, Silva PVVT, Gomes Neto A, Gomes AA, de Souza EM, Cintra ML, Leite NJ: Application of the new fast Fourier transform derived variables in dermatopathology. *Pathol Res Pract* 2003;199:242
- van Zuijlen PPM, Ruurdaa JJB, van Veend HA, van Marle J, van Trier AJ, Groenevelt F, Kreis RW, Middelkoop E: Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. *Burns* 2003; 29:423–431
- Adam RL, Leite NJ, De Carvalho RB, Silva PV, Metze K: Granulometric residues as a diagnostic tool in cytology. *Cytometry* 2004;59A:63
- Metze K, Adam RL, Silva PV, De Carvalho RB, Leite NJ: Analysis of chromatin texture by Pinkus’ approximate entropy. *Cytometry* 2004;59A:63
- Metze K, Piazza ACS, Piazza AA, Adam RL, Leite NJ: Texture analysis of AgNOR stained nuclei in lung cancer. *Cell Oncol* 2005;27:137–138
- Van De Wouwer G, Weyn B, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E, Van Dyck D: Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei. *J Microscopy* 2000;197:25–35
- Metze K, Bedin V, Adam RL, Cintra ML, de Souza EM, Leite NJ: Parameters derived from the fast Fourier transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cell Oncol* 2005;27:137
- Fourier J: *Théorie Analytique de la Chaleur*. First edition. 1822. Réédition aux Éditions Jacques Gabay, Paris, 1988
- Metze K, Adam RL, Leite NJ: Cell music. The sonification of fast-Fourier-transformed microscopic images. *Proc IX Bra-*

- zilian Symp Computer Music 2003;9:114-119. [http://gsd.ime.usp.br/sbcm/2003/papers/dKonradin\\_Metze.pdf](http://gsd.ime.usp.br/sbcm/2003/papers/dKonradin_Metze.pdf), accessed \_\_\_\_\_
24. Adam RL, Leite NJ, Metze K: Spectral analysis using discrete Fourier transformation for the study of nuclei: Software design and application on cardiomyocytes during physiological development. *Anal Cell Pathol* 2001;22:64-65
  25. Cia EMM, Trevisan M, Metze K: Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: A helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. *Cytopathology* 1999;10:30-39
  26. Irazusta SP, Vassallo J, Magna LA, Metze K, Trevisan M: The value of PCNA and AgNOR staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa. *Pathol Res Pract* 1998;194:33-39
  27. Lorand-Metze I, Metze K: AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol Clin Mol Pathol* 1996;49:M357-M360
  28. Haralick RM, Shanmuga K, Dinstein I: Textural features for image classification. *IEEE Trans Systems Man Cybernetics* 1973;SMC3:610-621
  29. Garcia FAR, Ranger-Moore J, Barker B, Davis J, Brewer M, Lozevski J, Vinyak S, Liu Y, Yemane J, Hatch KD, Alberts DS, Bartels HC, Bartels PH: Karyometric image analysis for intraepithelial and invasive cervical lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:141-150
  30. Ranger-Moore J, Bartels PH, Bozzo P, Einspahr J, Liu Y, Saboda K, Alberts DS: Karyometric analysis of actinic damage in unexposed and sun-exposed skin and in actinic keratoses in untreated individuals. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:155-165
  31. Choi HJ, Choi IH, Kim TY, Cho NH, Choi HK: Three-dimensional visualization and quantitative analysis of cervical cell nuclei with confocal laser scanning microscopy. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:174-180
  32. Ranger-Moore J, Frank D, Lance P, Alberts D, Yozwiak M, Bartels HC, Einspahr J, Bartels PH: Karyometry in rectal mucosa of patients with previous colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:134-142
  33. Us-Krasovec M, Erzen J, Zganec M, Strojjan-Flezar M, Lavrencak J, Garner D, Doudkine A, Palcic B: Malignancy associated changes in epithelial cells of buccal mucosa: A potential cancer detection test. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:254-262
  34. Abu Eid R, Landini G: Morphometry of pseudoepitheliomatous hyperplasia: Objective comparison to normal and dysplastic oral mucosae. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:232-240
  35. Karakitsos P, Pouliakis A, Kordalis G, Georgoulakis J, Kittas C, Kyroudes A: Potential of radial basis function neural networks in discriminating benign from malignant lesions of the lower urinary tract. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:35-42
  36. Ramos D, Ruiz A, Morell L, Navarro S, Villamon R, Gil-Salom M, Llombart-Bosch A: Prognostic value of morphometry in low grade papillary urothelial bladder neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:285-294
  37. Metze K, Souza Filho W, Adam RL, Lorand-Metze IGH, Leite NJ: Analysis of the component "tree" as a new tool for analytical cellular pathology. *Anal Cell Pathol* 2001;22:64-64
  38. Wu HS, Xu R, Harpaz N, Burstein D, Gil J: Segmentation of microscopic images of small intestinal glands with directional 2-D filters. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:291-300
  39. Choi HJ, Choi IH, Cho NH, Choi HK: Color image analysis for quantifying renal tumor angiogenesis. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:43-51
  40. Glotsos D, Spyridonos P, Cavouras D, Ravazoula P, Dadioti PA, Nikiforidis G: Automated segmentation of routinely hematoxylin-eosin-stained microscopic images by combining support vector machine clustering and active contour models. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;26:331-340
  41. Tarta C, da Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Neto CC, Tanaka S: Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;26:201-206
  42. Meschino GJ, Moler E: Semiautomated image segmentation of bone marrow biopsies by texture features and mathematical morphology. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;26:31-38
  43. Metze K, Gomes Neto A, Adam RL, Gomes AA, Leite NJ, Souza EM, Cintra ML: Texture of dermal elastotic tissue in patients with different phenotypes. *Analyt Cell Pathol* 2002;24:196
  44. Nafe R, Glienke W, Burgemeister R, Gangnus R, Haar B, Pries A, Schlote W: Regional heterogeneity of EGFR gene amplification and nuclear morphology in glioblastomas: An investigation using laser microdissection and pressure catapulting. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:65-76
  45. Matsuoka LY, Kousseff BG, Hashimoto K: Studies of the skin in Sjögren-Larsson syndrome by electron microscopy. *Am J Dermatopathol* 1982;4:295-301