

DANIEL ZANETTI SCHERRER

**ESTUDO DAS BASES MOLECULARES PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA TIPO II**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**ESTUDO DAS BASES MOLECULARES PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA TIPO II**

DANIEL ZANETTI SCHERRER

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner.

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Sch28e Scherrer, Daniel Zanetti, 1981 -
Estudo das bases moleculares para cutis laxa
autossômica recessiva tipo II / Daniel Zanetti Scherrer. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Carlos Eduardo Steiner.
Coorientador : Cláudia Vianna Maurer Morelli.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cutis laxa. 2. Síndrome da pele enrugada. 3.
Gerodermia osteodisplástica. 4. Biologia molecular. 5.
Perfil da expressão gênica. I. Steiner, Carlos Eduardo.
II. Morelli, Cláudia Vianna Maurer. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of the molecular basis for type II autosomal recessive cutis
laxa.

Palavra-chave em inglês:

Cutis laxa

Wrinkly skin syndrome

Gerodermia osteodysplastica

Molecular biology

Gene expression profile

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Steiner [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Chong Ae Kim

Mônica Barbosa de Melo

Vera Lucia Gil da Silva Lopes

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Daniel Zanetti Scherrer

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Co-Orientadora: Profa. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Camila Andréa de Oliveira

Professor (a) Doutor (a) Chong Ae Kim

Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo

Professor (a) Doutor (a) Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Professor (a) Doutor (a) Carlos Eduardo Steiner

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/02/2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Marina, por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bênção de viver;

À minha família, pelo carinho e apoio incondicional em tudo na minha vida;

A Angélica, pelo companheirismo e apoio fundamental;

Ao Carlos E Steiner, pela dedicação, paciência, orientação e amizade;

A Cláudia Morelli, pelo apoio laboratorial e ensinamentos sobre a vida;

Aos funcionários da FCM, pelos serviços prestados;

Aos membros da qualificação e banca, pelas ricas contribuições ao trabalho;

Aos amigos Fabiana, Milena, Ilária, Sabrina e Táris pelos bons anos de convivência;

A Jaira e Cris, por toda contribuição na execução do projeto e paciência;

A Marcella, pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho;

Ao Alexandre, pela amizade e ajuda;

Aos amigos do CBMEG, eternos;

A Madá, pelo bom humor sempre contagiante;

A Maria Eugênia, pela disponibilidade e ajuda;

A Maria Letícia e Lucinha, pela contribuição ao trabalho;

A Bia e Jussara, por todo suporte dado;

Aos colegas de laboratório, pelo trabalho em equipe e os bons momentos juntos;

As agências de fomento, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxv
INTRODUÇÃO	29
1 - As várias formas de cutis laxa	30
2 - Gerodermia osteodisplástica e “síndrome da pele enrugada”	33
3 - Aspectos Moleculares	38
3.1. Gene <i>ATP6V0A2</i>	40
3.2. Gene <i>SCYL1BP1</i>	41
3.3. Gene <i>PYCR1</i>	42
3.4. Análise de Expressão em Larga Escala	46
OBJETIVOS	47
1 - Objetivo Geral	48
2 - Objetivos Específicos	48
CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
1 - Indivíduo 1	50
2 - Indivíduo 2	52
3 - Indivíduo 3	55
4 - Extração de DNA genômico de sangue periférico	60
5 - Amplificação por PCR dos genes candidatos	61
6 - Purificação dos produtos de PCR	64
7 - Purificação Enzimática (<i>Exo-Sap</i>)	65
8 - Reação de sequenciamento automático para produto de PCR	65
9 - Análise de Restrição	67
10 - Análises <i>in silico</i>	68
11 - Cultura e manutenção de fibroblastos.....	69
12 - Extração de RNA	71
13 - Purificação do RNA	72

14 - Expressão gênica	72
14.1. Sistema Affymetrix	72
14.2. Preparação dos alvos	73
14.3. Hibridização e detecção	74
14.4. Lavagem e detecção	75
14.5. Aquisição das imagens e análise dos dados	75
15 - PCR em tempo real	76
15.1. Síntese do cDNA	76
15.2. Protocolo de PCR em tempo real	77
RESULTADOS	80
1 - Gene <i>ATP6V0A2</i>	81
2 - Gene <i>SCYL1BP1</i>	87
3 - Gene <i>PYCR1</i>	90
4 - Análise do perfil de expressão dos indivíduos com CLAR tipo II	98
5 - PCR em tempo real	108
DISCUSSÃO	111
CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	134
1 - Anexo 1	135
2 - Anexo 2	137
3 - Anexo 3	138
4 - Anexo 4	139
5 - Anexo 5	141

LISTA DE TABELAS

1 -	Manifestações clínicas nas diferentes formas de cutis laxa congênita	33
2 -	Comparação entre a condição descrita como CLAR tipo II e a SPE	36
3 -	Diagnóstico diferencial entre GO e SPE	37
4 -	Comparação dos sinais clínicos apresentados entre os indivíduos com mutações nos genes <i>ATP6V0A2</i> e <i>PYCR1</i>	45
5 -	Principais características clínicas CLAR tipo II, SPE e GO	59
6 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>ATP6V0A2</i> ..	62
7 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>SCYL1BP1</i> ..	63
8 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>PYCR1</i>	63
9 -	Resultados das análises de predição do efeito da alteração p.A241V na proteína	94
10 -	Resumo das alterações encontradas nos genes <i>ATP6V0A2</i> , <i>SCYL1BP1</i> e <i>PYCR1</i> , incluindo SNPs	97
11 -	Número de genes identificados como expressão diferencial pelo método <i>RankProd</i>	102
12 -	Apresentação dos genes presentes no enriquecimento das categorias de ontologia gênica por meio do <i>software</i> DAVID para o maior <i>score</i>	107
13 -	Resultado da validação dos diferentes iniciadores e sondas (ensaios) utilizados	108
14 -	Comparação dos sinais clínicos apresentados entre indivíduos com mutações nos o gene <i>PYCR1</i> e os indivíduos do estudo	115

LISTA DE FIGURAS

1 -	Via de biossíntese da prolina e sua conexão com o ciclo da ureia	44
2 -	Heredograma do paciente 1	51
3 -	Paciente 1 com 19 anos de idade	52
4 -	Heredograma do paciente 2	53
5 -	Paciente 2, observa-se mãos com posições anormais dos dedos	54
6 -	Paciente 2, aspectos clínicos	55
7 -	Heredograma do paciente 3	56
8 -	Paciente 3 aos quatro anos, aspectos clínicos	57
9 -	Microscopia eletrônica de transmissão	58
10 -	Ciclo de amplificação dos genes candidatos	64
11 -	Ciclo utilizado na reação de sequenciamento automático	66
12 -	Representação esquemática da análise de restrição da alteração p.Q10X no gene <i>PYCR1</i>	68
13 -	Eletroforese em gel de agarose 1,0% na qual foram testadas as amostras de PCR do gene <i>ATP6V0A2</i>	81
14 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS1-15 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i>	82
15 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+103 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i> ..	82
16 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+214 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i> ..	83
17 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+217 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i> ..	83
18 -	Eletroferograma demonstrando a alteração p.N142N no gene <i>ATP6V0A2</i>	84
19 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS4+14 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i>	84
20 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS5-195 C>T do gene <i>ATP6V0A2</i> ..	85
21 -	Eletroferograma demonstrando a alteração p.S157S no gene <i>ATP6V0A2</i>	85
22 -	Eletroferograma mostrando a alteração IVS8-23 T>C do gene <i>ATP6V0A2</i>	86
23 -	Eletroferograma demonstrando alteração do aminoácido p.N505N no gene <i>ATP6V0A2</i>	86
24 -	Eletroferograma demonstrando a alteração p.A813V no gene <i>ATP6V0A2</i>	87
25 -	Eletroforese em gel de agarose 1,0% no qual foram testados os produtos da amplificação do gene <i>SCYL1BP1</i> por PCR	88
26 -	Eletroferograma demonstrando a alteração p.G32G em homozigose no gene <i>SCYL1BP1</i>	88

27 - Eletroferograma mostrando a alteração IVS3-28 T>C do gene <i>SCYL1BP1</i>	89
28 - Eletroferograma demonstrando a alteração p.E320K no gene <i>SCYL1BP1</i>	89
29 - Eletroforese em gel de agarose 1,0% na qual foram testadas as amostras de PCR dos sete éxons do gene <i>PYCR1</i>	89
30 - Eletroferograma mostrando o códon de iniciação (ATG) e a trinca de nucleotídeos correspondente ao códon 10 no gene <i>PYCR1</i>	91
31 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na qual foram testadas as análises de restrição para a mutação p.Q10X no gene <i>PYCR1</i>	91
32 - Alinhamento dos aminoácidos do gene <i>PYCR1</i> comparando os tipos selvagem e mutante	92
33 - Eletroferograma demonstrando a alteração p.A241V no gene <i>PYCR1</i>	93
34 - Alinhamento das sequências de proteína (aminoácido 241) do gene <i>PYCR1</i> em diferentes espécies	94
35 - Gráfico de contatos internos verificando o efeito da novas interações estabelecidas entre os aminoácidos alanina e valina	95
36 - Estrutura tridimensional da proteína PYCR1	96
37 - Eletroferograma demonstrando a alteração p.S301S em homozigose no gene <i>PYCR1</i>	96
38 - <i>Box-plot</i> e histograma dos dados brutos e pós normalização dos <i>chips</i> de CLAR tipo II	99
39 - PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre indivíduos e controle em pele fresca e fibroblastos	100
40 - <i>Cluster</i> hierárquico dos genes diferencialmente expressos em pele fresca de CLAR tipo II comparados com controles	101
41 - Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de genes diferentemente expressos que são comuns entre pele fresca e fibroblastos na CLAR tipo II ..	102
42 - Vias de sinalização moduladas pela assinatura de expressão gênica em CLAR tipo II	103
43 - Representação esquemática das redes gênicas baseadas nos genes diferencialmente expressos	104
44 - Painel descrevendo o enriquecimento para cada categoria de ontologia gênica (GO) baseado no <i>score</i> de enriquecimento (<i>Escore</i>)	106
45 - Curva de Padronização do PCR em Tempo Real	109

46 -	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>EZR</i> e <i>PALLD</i> , por PCR em tempo real, em pele fresca	101
47 -	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>EZR</i> e <i>PALLD</i> , por PCR em tempo real, em fibroblastos	101

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Autossômico dominante
AR	Autossômico recessivo
aRNA	RNA complementar biotinilado
ATP6V0A2	Gene “ <i>ATPase, H+ transporting lysosomal, V0 subunit A2</i> ”
CDG	Distúrbios Congênitos da Glicosilação (do inglês, <i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>)
cDNA	DNA complementar
CLAR	Cutis laxa autossômica recessiva
CP	Creatina fosfatase
CT	Ciclo limiar (do inglês, <i>Threshold Cycle</i>)
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
dbEST	<i>Database of expressed sequence tags</i>
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEG	Eletroencefalografia
Ensembl	<i>Ensembl Genome Browser</i>
F	<i>Forward</i>
FBLN4	Gene Fibulina 4
FBLN5	Gene Fibulina 5
FC	Coeficiente de variação (do inglês, <i>Fold change</i>)
GAA	Guanidino acetato
GO	<i>Gene Ontology</i>
GO	Gerodermia osteodisplástica
HGMD	<i>Human Gene Mutation database</i>
ID	Número de identificação da sonda
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
IVS	<i>intervening sequence</i>
LOX	Gene Lisil Oxidase
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OAT	Ornitina aminotransferase
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p.	Posição do aminoácido na proteína
pb	Pares de base
PCA	Análise de Componente principal (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PSA	Persulfato de amônia
PYCR1	Gene da Pirrolina-5-Carboxilato Redutase 1
R	<i>Reverse</i>
rs	<i>reference SNP</i>
RefSeq	<i>Reference sequence database</i>
RLX	Recessivo ligado ao X
RMA	Média de intensidade da sonda (do inglês, <i>Robust Multichip Averaging</i>)
RSB	Tris/KCl/MgCl ₂
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i>
SCYL1BP1	Gene " <i>Scyl1-Binding protein 1</i> "
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPE	Síndrome da pele enrugada
TA	Temperatura de anelamento
TAE	Tris/ácido acético/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris- (hidroximetil)- aminomenato
Wt	Tipo selvagem ou normal (do inglês, <i>wild type</i>)



RESUMO

Cutis laxa autossômica tipo II (CLAR tipo II) é um distúrbio raro do tecido conectivo em que a pele perde sua firmeza, cedendo excessivamente e conferindo ao indivíduo um aspecto envelhecido. Sugere-se que CLAR tipo II seja a mesma entidade descrita como “síndrome da pele enrugada” e gerodermia osteodisplástica. Tal confusão quanto à nomenclatura é, em parte, causada pelo conhecimento limitado de suas bases biológicas. O presente estudo visou analisar três famílias não aparentadas com quadro típico de CLAR tipo II para mutações nos genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1* e *PYCR1*. Nenhuma mutação foi identificada nos genes *ATP6V0A2* e *SCYL1BP1*. Por outro lado, a triagem de mutações por sequenciamento direto do DNA no gene *PYCR1*, que desempenha um papel crítico na biossíntese de prolina, revelou duas novas variantes (p.Q10X e p.A241V), com efeito patogênico predito por análises de bioinformática. Em complementação, foi determinado o perfil de expressão gênica em tecido de pele e fibroblasto a partir de dois indivíduos com CLAR tipo II pela investigação de microarranjos, identificando os genes e as vias metabólicas possivelmente alteradas em tal condição, com a finalidade de entender os mecanismos subjacentes a este tipo de cutis laxa. Foi utilizado o *Human Genome U133 Plus 2.0 array* (Affymetrix™), e analisados por meio dos pacotes *Affy* e *RankProd* do *BioConductor*. O perfil transcricional apresentado por pele fresca pela análise de microarranjos nos indivíduos com CLAR tipo II detectou 542 genes diferencialmente expressos em comparação com controles saudáveis pareados por sexo, idade e topografia anatômica. A análise de enriquecimento das categorias de ontologia gênica, utilizando o programa DAVID, incluiu a diferenciação e desenvolvimento epidérmico, ectodérmico e de queratinócitos. As vias de sinalização mais ativadas analisadas por *software Ingenuity* foram relacionadas a doenças e condições dermatológicas, além de “câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular”, bem como o metabolismo lipídico. Este é o primeiro estudo utilizando investigação de microarranjos na doença CLAR tipo II. Os resultados incluíram duas novas alterações genéticas (p.Q10X e p.A241V), além de fornecer uma visão completa das vias celulares diferencialmente expressas em tal condição. Desta forma, estes resultados contribuem para uma melhor compreensão da CLAR tipo II quanto aos mecanismos moleculares e nosologia.



ABSTRACT

Autosomal recessive cutis laxa, type 2 (ARCL2), is a rare disorder of connective tissue in which the skin sags excessively, giving to the individual an aged aspect. It has been suggested that ARCL2 is the same entity described under the denominations of wrinkly skin syndrome and geroderma osteodysplastica. Such confusion is caused, in part, due to limited knowledge of its molecular basis. In the present study three unrelated families with ARCL2 were analyzed for mutations in *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1*, and *PYCR1*. No causative mutations were identified in *ATP6V0A2* and *SCYL1BP1*. However, screening for mutations in *PYCR1* revealed two new variant (p.Q10X and p.A241V) by direct DNA sequencing, with predicted pathogenic effect on bioinformatic analysis. In complementation, in order to shed some light into the molecular mechanisms underlying this type of cutis laxa, gene expression profile in skin tissue and fibroblast were studied in two patients with ARCL2 using microarray investigation. This study was performed using the Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix™), and analyzed using Affy and RankProd packages from Bioconductor. Transcriptional profiling in skin tissue by microarray analysis from ARCL2 patients detected 542 differentially expressed genes compared to healthy controls matched by gender, age, and anatomic region. The top enriched gene ontology categories analyzed by DAVID included the differentiation and development of keratinocytes, epidermis and ectoderm. Among the most activated signaling pathways analyzed by Ingenuity *software* were related diseases and dermatological conditions and “cancer, connective tissue development and function, skeletal and muscular systems” as well as lipid metabolism. This is the first study using microarray investigation in the ARCL2 disease. Our results include two new genetic alterations (p.Q10X and p.A241V) and also provide a complete view of cellular pathways differentially expressed in such condition. The present study contributed to a better understanding of ARCL2 molecular mechanisms and nosology of this group.



INTRODUÇÃO

1. As várias formas de cutis laxa

A alteração cutânea avaliada no presente estudo foi descrita sob diversas denominações como calazoderma, dermatocalasis, paquidermatocele, dermatomegalia, dermatólise, elastólise primária, elastólise generalizada, edema elastolítico, cutis laxa e “pele enrugada”. Todos estes termos descrevem a pele redundante, de aspecto solto em diferentes partes do corpo e conferindo um aspecto senil para os indivíduos afetados (1). Deve ser diferenciada da pele hiperelástica, a qual pode ser estendida, porém retorna à posição inicial quando a tração cede, como ocorre na síndrome de Ehlers-Danlos. Trata-se de um conjunto de condições com diversas causas, incluindo fatores ambientais e doenças geneticamente determinadas (2-4).

A cutis laxa adquirida, ou seja, determinada por fatores ambientais, tem início tardio, normalmente após a puberdade, e eventualmente muito mais tarde. Inflamações e edemas podem preceder o desenvolvimento de pele solta e pendurada, podendo aparecer de forma generalizada ou localizada (5-7).

Nas formas geneticamente determinadas, as alterações estão presentes ao nascimento ou se desenvolvem nos primeiros meses de vida. Com o passar do tempo, formam-se dobras de pele que pendem para baixo na face e no abdome, fazendo com que as crianças aparentem ser prematuramente idosas.

Ainda em relação à cutis laxa hereditária, ocorre heterogeneidade genética, havendo uma forma autossômica dominante, uma forma recessiva ligada ao cromossomo X e três formas autossômicas recessivas (tipos I, II e III) (2,4), além de diversas outras condições nas quais a cutis laxa pode ocorrer dentro de um quadro sindrômico (3).

A forma autossômica dominante de cutis laxa (OMIM 123700) tem repercussão basicamente de ordem estética, com doença leve, de início variável, poucas manifestações viscerais (valvopatias, hérnias, enfisema) e bom prognóstico, além de expectativa de vida normal (8). Embora provavelmente tenha sido descrita pela primeira vez por Rossbach em 1884 *apud* Gorlin et al. (9), esta forma é menos comum que as formas autossômicas recessivas.

A forma recessiva ligada ao cromossomo X (OMIM 304150), também conhecida como *occipital horn syndrome*, anteriormente classificada como síndrome de Ehlers-Danlos tipo IX, é um distúrbio no metabolismo de cobre, com deficiência associada à lisil oxidase. Clinicamente se caracteriza por displasia do esqueleto incluindo espícula óssea occipital, clavículas amplas e curtas, hiper mobilidade de membros, diarreia crônica e uropatia obstrutiva. Uma característica distinta é a formação de espículas ósseas simetricamente situadas em cada lado do forame magno, visíveis ao exame radiológico convencional (9-11).

As formas autossômicas recessivas de cutis laxa (CLAR) são raras e divididas em três tipos distintos. A CLAR tipo I, também denominada “elastólise generalizada” (OMIM 219100), associa-se a hérnias, inclusive diafragmática, divertículos dos tratos intestinal e urinário, enfisema pulmonar e tortuosidade e (ou) aneurismas arteriais. O quadro clínico é grave e geralmente resulta em óbito ainda no primeiro ano de vida (4,12).

A CLAR tipo II, também denominada “cutis laxa com distrofia óssea” ou “cutis laxa com déficit de crescimento e de desenvolvimento” (OMIM 219200), termo cunhado por Debré et al. (13), refere-se a uma condição que se caracteriza por déficit de crescimento pré e pós-natal, sendo o peso e o comprimento ao nascimento abaixo do décimo percentil, desenvolvimento neuromotor atrasado resultando em deficiência mental de leve a moderada, hipotonia muscular, aparência senil, abaulamento frontal, bochechas penduladas, sobrancelhas em formato de “V” invertido, fontanelas amplas, hérnias múltiplas, luxação do quadril, ossos Wormianos, escoliose e osteoporose. As manifestações dismórficas da face incluem, ainda, dolicocefalia, fendas palpebrais oblíquas para baixo, hipertelorismo ocular, filtro nasolabial longo, orelhas antevertidas e de implantação baixa, pregas epicânticas, esclera azul, nariz pequeno com a ponte nasal baixa e narinas antevertidas, bem como micrognatia. Há atraso no fechamento das fontanelas, especialmente a anterior, e as suturas do crânio são notadamente separadas. Fenda labial também foi descrita. Relatos menos constantes incluem coloboma macular, miopia e hipoplasia de íris. Nos membros, podem ser vistas outras

anomalias secundárias como clinodactilia de quintos quirodáctilos e prega palmar única (1, 4, 12, 14, 15, 17).

Em relação aos aspectos cutâneos da CLAR tipo II, ocorre o aspecto típico de pele frouxa e pendular, especialmente no dorso, abdome e extremidades dos membros. As veias superficiais do abdome são notadamente visíveis e o músculo abdominal é frouxo (1, 4, 12, 14, 15). Achados histológicos incluem agregação, fragmentação e deformidade das fibras elásticas (1,16).

A CLAR tipo III, também denominada “síndrome de De Barsy” (OMIM 219150) associa a cutis laxa ao déficit de crescimento pré e pós-natal, atraso neuropsicomotor grave, opacificação de córneas e movimentos pseudoatetóides, esses dois últimos começando até o segundo ano de vida (15, 18, 19).

A tabela 1 mostra as diferentes manifestações clínicas das formas de cutis laxa congênita.

Tabela 1 - Manifestações clínicas nas diferentes formas de cutis laxa congênita (modificado de Nanda et al. (20)).

Manifestações Clínicas	AD	AR	AR	AR	RLX
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	
Início	Variável	Nasc	Nasc	Nasc	Nasc
Déficit de crescimento pré e pós-natal	-	+	+	+	-
Cutis laxa	+	+	+	+	+
Dismorfismos faciais	-	+	+	+	-
Hérnias múltiplas	+	+	+	-	-
Divertículos (intestinal e urinário)	-	+	+	-	-
Displasia óssea/ frouxidão ligamentar	-	+	+	+	+
Deficiência mental	-	+	+	+	-
Luxação congênita dos quadris	-	-	+	-	-
Opacificação de córneas	-	-	-	+	-
Enfisema pulmonar	+	+	-	-	-
Anomalias cardíacas	+	+	-	-	-
Anormalidades do trato urinário	-	-	-	-	+
Espículas ósseas occipitais	-	-	-	-	+
Metabolismo anormal de cobre	-	-	-	-	+

Legenda: +, presente; -, ausente; AD, autossômico dominante; AR, autossômico recessivo; RLX, recessivo ligado ao X; Nasc, nascimento.

2. Gerodermia osteodisplástica e “síndrome da pele enrugada”

Bamatter et al. (21) relataram uma família que apresentava pele frouxa, especialmente no dorso das mãos e dos pés, dismorfismos faciais, hiperextensibilidade articular e atraso do desenvolvimento neurológico global em alguns casos, bem como alterações radiológicas que incluíam osteoporose e ossos Wormianos. Essa condição foi chamada de gerodermia osteodisplástica, ou geroderma osteodisplástico (GO; OMIM 231070), e o padrão de herança inicialmente sugerido foi o recessivo ligado ao X. Trabalhos posteriores, porém,

definiram haver herança autossômica recessiva. Achados histológicos incluem agregação, fragmentação e deformidade das fibras elástica (22-24).

Em 1973, Gazit et al. (25) descreveram uma condição por eles denominada de *wrinkly skin syndrome* (“síndrome da pele enrugada”, SPE; OMIM 278250), de herança autossômica recessiva e caracterizada por pele frouxa e enrugada sobre o dorso das mãos, dos pés e do abdome, aumento de pregas palmares e plantares, luxação do quadril, retardo de crescimento pré e pós-natal, atraso neuropsicomotor, achados dismórficos de face e fontanelas amplas. Não há detalhamento das alterações radiológicas nesse trabalho ou nas publicações posteriores com esse diagnóstico. Achados histológicos incluem agregação, fragmentação e deformidade das fibras elásticas (26).

Tal sobreposição de achados clínicos e histológicos passou inadvertida na literatura durante muito tempo até que, em 1999, Zlotogora (27) propôs que a CLAR tipo II e a SPE fossem a mesma condição. Dois anos mais tarde, Al-Gazali et al. (28) fizeram a mesma associação com a GO.

A sobreposição clínica nestes diagnósticos foi notada precocemente e muitos autores relataram pacientes sob uma designação, citando outros termos como diagnósticos diferenciais. Alguns achados clínicos foram usados para justificar o uso de um termo em preferência aos outros. Em GO, por exemplo, alterações na desproporção de segmentos corporais, provavelmente devido a platispondilia, e ausência de veias superficiais visíveis foram usadas para diferenciar GO de cutis laxa. É interessante notar que alguns achados são mais frequentemente descritos usando um termo que outro. Fontanelas ampla é uma anomalia constante relatada em CLAR tipo II e em muitos casos de GO, mas foi descrita em apenas um paciente diagnosticado com SPE, enquanto sulcos palmares aumentadas são achados constantes em SPE, mas não são mencionados nos relatos de CLAR tipo II. Em GO, o termo “nanismo tipo Walt Disney” foi usado em vários relatos (especialmente nos iniciais), fato que influenciou muito os autores subsequentes. Isto pode ser um exemplo de um viés de descrição por diferentes autores, onde os relatos clínicos tendem a se basear em comparações com descrições prévias (1).

Mais recentemente, surgiram novas controvérsias sobre essa sobreposição de sinais clínicos. O trabalho de Gupta e Phadke (29), no qual são descritos três novos pacientes pertencentes a duas famílias de origem indiana com CLAR tipo II, volta a lançar dúvidas sobre o quanto essa doença e a SPE são, de fato, a mesma condição. O trabalho de Boente et al. (30) descreve dois pacientes do sexo masculino com GO, e também volta a separar a GO da SPE. Assim, esses dois grupos de autores propuseram que tais condições voltassem a ser consideradas entidades distintas, baseados em determinados achados clínicos, radiológicos e histológicos (tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Comparação entre a condição descrita como CLAR tipo II e a SPE (modificado de Gupta e Phadke (29)).

Características	CLAR tipo II				SPE	
	1	2	3	4	5	6
Fendas palpebrais antimongolóides (oblíquas para baixo)	+	+	-	NM	-	?
Hipertelorismo	+	+	+	+	-	-
Esclera azulada	?	+	+	+	-	-
Bochechas penduladas	+	+	+	-	-	-
Filtro longo	+	+	+	NM	-	-
Hipoplasia de face média	+	-	-	NM	+	-
Macrotia e micrognatia	?	?	?	?	?	+
Baixa estatura	+	+	+	+	+	+
Microcefalia	+	+	-	NM	+	+
Fontanela ampla	+	+	+	+	NM	NM
Hérnia (inguinal/umbilical)	+	+	-	+	-	NM
Escápula alada	NM	NM	NM	NM	+	NM
Veias cutâneas superficiais proeminentes	+	+	+	+	+	+
Atraso no desenvolvimento	+	+	+	+	+	+
Pele frouxa	+	+	(suave)	(suave)	+	+
				Sobre Abdômen		Acral e na posição sentada
Luxação do quadril	+	-	-	NM	+	+
Frouxidão ligamentar	+	+	-	+	+	+
Prega palmar única	+	+	+	+	Excesso de pregas palmares e plantares	
Peito escavado	-	+	-	+	-	NM
Defeito cardíaco	-	-	-	-	CIA	NM
Defeito renal	-	-	-	+	-	NM
Achados histológicos	NM	Ausência de fibras elásticas	Não estudado	Não estudado	Diminuída em número e comprimento de fibras elásticas	Não estudado

Legenda: +, presente; -, ausente; NM, não mencionado; ?, desconhecido; CIA, comunicação interatrial; 1- Imaizumi et al. (4); 2- Paciente 1 do Ogur et al. (31); 3- Paciente 2 do Ogur et al. (31); 4- Goldblatt et al. (32); 5- Casamassima et al. (33); 6- Azuri et al. (34).

Tabela 3 - Diagnóstico diferencial entre GO e SPE (modificado de Boente et al. (30)).

Manifestações Clínicas	GO	SPE
Facial	Bem caracterizado	Não bem definido
Pele	Bochechas flácidas Pele atrófica e enrugada sobre mãos/pés e abdome com diminuição da elasticidade Aumento do pregueamento palmar/plantar	Bochechas não flácidas Pele atrófica e enrugada sobre mãos/pés e abdome com diminuição da elasticidade Aumento do pregueamento palmar/plantar
Envergadura/altura	Aumentado	Normal
Desenvolvimento mental	Normal	Atrasado
Habilidade motora	Atrasado	Hipotonia – levemente atrasado
Articulações	Hipermotilidade de articulações das extremidades Diminuição da extensão de cotovelos Peito escavado ou carenado	Frouxidão articular infrequente?
Esqueleto	Cifose	Desconhecido
Características radiológicas	Osteopenia Fraturas Deformidades vertebrais Epífises em forma de cone Lingueta metafisária	Não relatado
Características histológicas	MO: Fibras elásticas: escassas nas papilas e fragmentadas na derme reticular ME: Fibras elásticas: morfologia normal com relacionamento normal entre componentes fibrilar e amorfo (elastina) Alguns sinais de fragmentação	MO: Fibras elásticas: escassas nas papilas e fragmentadas na derme reticular ME: Alterações na composição das fibras elásticas (prevalência de microfibrilas anormais com elastina amorfa escassa) Na secção longitudinal, disrupção dos feixes miofibrilares

Legenda: MO, microscopia óptica; ME, microscopia eletrônica; ?, não especificada.

Até a presente data, aproximadamente 100 casos foram descritos na literatura, sendo mais da metade nomeados como CLAR tipo II, seguidos de GO e SPE, respectivamente, como denominações mais frequentes. A literatura é confusa quanto à descrição de alguns casos, o que poderia ser explicado por (a) expressividade variável desse distúrbio, (b) viés de descrição clínica, visto que muitos pesquisadores tendem a reproduzir o conhecimento a partir de relatos de autores prévios, ou (c) a ausência de achados específicos (especialmente histológicos e radiológicos) em muitos pacientes pela simples falta da pesquisa desses sinais. Assim, relatos de casos bem documentados incluindo exames histológicos e radiológicos são necessários para a melhor caracterização dessa entidade e o uso de diferentes denominações deverá continuar confuso até que as bases moleculares sejam esclarecidas e possam ajudar a criar uma denominação definitiva (1, 29).

No entanto, nos últimos anos um esforço no sentido de se conhecer os mecanismos moleculares em que se baseiam e se diferenciam essas doenças têm aumentado, e estão resumidos a seguir.

3. Aspectos Moleculares

Tanto para as formas congênitas quanto para as adquiridas, a patogênese da cutis laxa ainda não é totalmente compreendida. Com relação às formas geneticamente determinadas, alguns genes foram identificados.

A forma autossômica dominante de cutis laxa está relacionada a mutações no gene da elastina (*ELN*), localizado em 7q11.2 (35, 36) e no gene da fibulina 5 (*FBLN5*) (37). A cutis laxa ligada ao cromossomo X é alélica à síndrome de Menkes, portanto causada por mutações no gene *ATP7A*, localizado em Xq12-13 (38). A CLAR tipo I foi identificada como relacionada a mutações no gene das fibulinas 4 e 5 (*FBLN4* e *FBLN5*), nos cromossomos 11q13.1 e 14q32.1, respectivamente, porém na maioria dos casos a etiologia genética é indeterminada (39). Os mecanismos genéticos para CLAR tipo III foram recentemente associados ao gene *PYCR1*, localizado em 17q.25 (40).

Khakhoo et al. (41) descreveram dois pacientes do sexo masculino com achados clínicos e histológicos semelhantes, bem como deficiência de lisil oxidase, uma enzima codificada pelo gene *LOX* (OMIM 153455), localizado no cromossomo 5q23.1-q23.2. Apesar de ser sugerido pelos autores que seus pacientes apresentavam uma forma não descrita de cutis laxa, a ocorrência de déficit de crescimento pré e pós-natal, atraso no desenvolvimento neurológico, pele generalizadamente frouxa e enrugada, frouxidão articular, luxação do quadril, osteoporose e ossos Wormianos, além de consanguinidade parental em um dos casos, nos sugere que esses pacientes representam descrições adicionais de CLAR tipo II, SPE ou GO.

Por outro lado, a CLAR tipo I, além de compartilhar muitos sinais clínicos com o tipo II, também apresenta alterações histológicas envolvendo as fibras elásticas. Loeys et al. (42) em uma extensa família de origem turca com CLAR tipo I, encontraram homozigose nos indivíduos afetados para a mutação S227P no gene da fibulina 5 (*FBLN5*, *EVEC* ou *DANCE*; OMIM 604580). Markova et al. (37) analisaram a expressão da elastina e das fibulinas 1-5 nos fibroblastos de cinco pacientes com cutis laxa autossômica dominante, sendo observada uma duplicação *in tandem* no gene *FBLN5* em heterozigose em um dos pacientes. Ainda na família das fibulinas, o trabalho de Huchtagowder et al. (43) identificou uma mutação missense (169G→A; E57K) no gene da fibulina 4 (*FBLN4*, *MBP1* ou *EFEMP2*; OMIM 604633) a partir de um paciente com CLAR I. Assim, um segundo gene dentro da família das fibulinas foi envolvido com as formas autossômicas recessivas de cutis laxa. Estes estudos sugerem que ambas as fibulinas, 4 e 5, tenham papéis importantes na elastogênese.

Nosso grupo de estudo, em 2008, publicou os resultados das análises dos genes *LOX*, *FBLN4* e *FBLN5* nos indivíduos que constituem a casuística desta pesquisa sendo que nenhuma mutação deletéria foi detectada que justificasse as características clínicas dos pacientes (17).

3.1 Gene *ATP6V0A2*

Recentemente CLAR tipo II e SPE surgiram novamente no centro das atenções, devido à descoberta de uma base etiológica metabólica, um erro inato do grupo dos Distúrbios Congênitos da Glicosilação (CDG). A alteração é responsável pelo fenótipo em diversos indivíduos diagnosticados com CLAR tipo II e SPE. A alteração está presente no gene *ATP6V0A2*, que codifica a subunidade alfa 2 da H⁺ATPase tipo IV. Curiosamente, o produto do gene é fortemente expresso e detectável no fígado e nos rins, que não estão especificamente envolvidos no fenótipo. A glicosilação anormal de algumas proteínas plasmáticas tem sido demonstrada em indivíduos afetados. Considera-se que esta alteração eventualmente afete a biossíntese e processamento dos glicanos, influenciando o gradiente de pH no complexo de Golgi. A biossíntese dos glicanos ocorre em muitos tipos de células, e a glicosilação é essencial para a modificação pós-sintética de muitas proteínas intracelulares e para sua secreção. O defeito na V-ATPase pode levar a uma doença metabólica multissistêmica, causando N- e O-glicosilação anormal. A glicosilação também é essencial para o desenvolvimento fetal. Portanto, não é de estranhar que alguns indivíduos com alterações da combinação da biossíntese de N- e O-glicanos apresentem alteração no desenvolvimento congênito do sistema nervoso central (39, 44, 45).

O papel fundamental de V-ATPases foi demonstrado em vários erros inatos do metabolismo, causando diferentes doenças metabólicas associadas com órgãos internos, anormalidades esqueléticas, características dismórficas, doenças renais e perda auditiva, além de retardo mental e de desenvolvimento (39).

Kornak et al. (44) descreveram mutações em pacientes com CLAR tipo II e perda de função do gene *ATP6V0A2*, este mapeado no cromossomo 12 (12q24.31), constituído por 47.576 pb e organizado em 20 éxons, sendo que a subunidade alfa 2 contém 856 aminoácidos. Foram relatadas mutações no gene *ATP6V0A2* em famílias consanguíneas e em casos esporádicos (39). Este mesmo grupo investigou 12 famílias e encontrou 10 diferentes mutações que causavam

perda de função na proteína, sendo quatro mutações de sítio de *splicing*, três *nonsense* e três mutações do tipo *frameshift*.

Desde então, diferentes mutações foram detectadas em CLAR tipo II e SPE sem uma correlação clara entre genótipo-fenótipo (45). Além disso, uma nova sugestão de nomenclatura propõe classificar CLAR tipo IIA (OMIM 219200), para indivíduos com alteração no gene *ATP6V0A2*.

As características clínicas apresentadas nos indivíduos com alteração do gene *ATP6A2* (OMIM 179035) incluem cutis laxa congênita, pele excessiva, retardo do crescimento intra-uterino, falha no desenvolvimento fisiológico, microcefalia, dismorfismos múltiplos, fontanela ampla e de fechamento tardio. Além disso, há hipotonia, problemas de alimentação, de articulações e pode ocorrer distribuição anormal de gordura corporal. As anomalias oculares mais comuns são estrabismo e miopia. Alterações esqueléticas incluem luxação congênita de quadril e diminuição da densidade óssea. Atraso de crescimento é observado na maioria dos casos e os sintomas neurológicos incluem retardo psicomotor, convulsões, perda auditiva e disgenesia cerebral (46).

3.2 Gene *SCYL1BP1*

Até agora, alterações na glicosilação ou mutação no gene *ATP6V0A2* não foram identificadas em pacientes com GO. Hennies et al. (47) identificaram uma região homozigota no cromossomo 1q24.2 em 12 indivíduos afetados a partir de quatro famílias Memonitas não relacionadas com GO da Alemanha, México e Canadá. Uma mutação *nonsense* em homozigose, 367G>T no gene *SCYL1BP1* (também denominado de *FLJ11752*, *NTKLBP1*, *GORAB*) foi identificada em todos os indivíduos afetados das quatro famílias, sendo consistente com um efeito fundador.

Em nove indivíduos adicionais com GO foram encontradas oito outras mutações, incluindo cinco mutações *nonsense*, duas mutações *frameshift*, uma mutação no sítio de *splicing* e uma mutação do códon de iniciação deduzido

metionina. O gene *SCYL1BP1* humano é composto por 394 códons e sua sequência é altamente conservada entre as espécies.

Utilizando PCR quantitativo de tecido de rato com cinco dias de vida, Hennies et al. (47) encontraram o gene *SCYL1BP1* altamente expresso em pulmão, pele e osteoblastos, expressão essa que se correlaciona com os principais locais de manifestação da doença. A análise de *Western blot* mostrou expressão aumentada durante a diferenciação dos osteoblastos. Essa expressão também esteve presente em osteoclastos, mas em níveis mais baixos. A microscopia de imunofluorescência localizou *SCYL1BP1* no complexo de Golgi, sendo que a análise de duplo híbrido identificou interação específica de *SCYL1BP1* com Rab6.

Uma função importante do Rab6 é o recrutamento de proteínas motoras que promovem o movimento de vesículas celulares. Rab6 é conhecido por estar envolvido no transporte retrógrado de endossomas para o aparelho de Golgi e tem um papel crucial na via de excreção do Complexo de Golgi para a membrana plasmática (47).

Al-Dosari e Alkuraya (48) em 2009 apresentaram duas novas mutações do tipo *missense* no gene *SCYL1BP1* em quatro famílias sauditas com quadro clínico idêntico ao apresentado por Hennies et al. (47).

3.3 Gene *PYCR1*

Considerando SPE e CLAR II como a mesma entidade, Reversade et al. (40) identificaram alterações no gene *PYCR1* em 35 indivíduos de 22 famílias com fenótipo característico de CLAR tipo III, SPE e GO. O estudo caracterizou oito mutações *missense*, uma mutações *frameshift*, cinco mutações de sitio de *splicing* e uma deleção englobando a junção éxon-íntron 5.

O gene *PYCR1* (*Pirrolina-5-Carboxilato Redutase 1*) está localizado no cromossomo 17q.25 e é organizado em sete éxons. Seu produto é uma enzima envolvida no metabolismo da prolina, localizada na mitocôndria. Alterações na morfologia da mitocôndria, no potencial da membrana e o aumento na taxa de

apoptose após estresse oxidativo foram evidenciados nos fibroblastos dos indivíduos afetados. Da mesma forma, modelos *knockdown* em *Xenopus* sp (sapo africano) e *Danio rerio* (peixe paulistinha) resultaram em hipoplasia epidérmica e bolhas, acompanhadas por um aumento maciço de apoptose (40).

No mesmo ano, Guernsey et al. (49) relacionaram uma mutação *missense* também no gene *PYCR1* em cinco membros de duas famílias canadenses com quadro clínico de CLAR tipo II.

O passo inicial para a biossíntese da prolina é a conversão do ácido glutâmico em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) pela ação da P-5-C sintetase (P5CS) ou, alternativamente, a partir de ornitina, pela enzima ornitina aminotransferase (OAT), passo crítico na biossíntese da ornitina, arginina, citrulina e prolina. Esta ação é seguida pela redução da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato em prolina pela P-5-C redutase 1 (PYCR1). A degradação da prolina é catalisada por duas enzimas, a prolina oxidase catalisa a conversão de prolina em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato que é, então, oxidada a glutamato pela P-5-C desidrogenase (50). O esquema da biossíntese da prolina está representado na figura 1.

Tabela 4 - Comparação dos sinais clínicos apresentados entre os indivíduos com mutações nos genes *ATP6V0A2* e *PYCR1* (modificado de Mohamed et al. (46)).

	<i>ATP6V0A2</i>	<i>PYCR1</i>
Cutis laxa	++	++
Retardo psicomotor	+	+
Convulsões	+/-	+
Neuropatias	-	-
Hipotonia	+	-
Movimentos atetóides	-	++
Disgenesia cerebral	++/-	-
Hipoplásica do corpo caloso	-	++/-
Fontanela ampla/Fechamento tardio	++	-
Microcefalia	+	+/-
Dismorfismos faciais	++	+
Retardo no crescimento	+	+
Hiperfrouxidão articular	++	+
Polegares aduzidos/artrogripose distal	-	++
Hérnias	+	++
Catarata	-	+/-

Legenda: +, presente (+ = leve, ++ = moderada); -, ausente; ?, desconhecido.

Considerando o que foi exposto, especialmente com relação ao trabalho de Reversade et al. (40), Kornak et al. (44), Hennies et al. (47) e Guernsey et al. (49), as bases genéticas desse grupo de distúrbios que inclui a CLAR tipo II, a SPE e a GO mostram-se complexas e ainda não totalmente esclarecidas. Além disso, é importante mencionar que alguns pacientes com esse fenótipo não apresentam mutações identificadas nesses genes, sugerindo que possivelmente outro(s) gene(s) estejam envolvido(s).

3.4. Análise de Expressão em Larga Escala

O ganho contínuo de informações sobre a sequência de genomas inteiros pelo Projeto Genoma Humano tem cada vez mais desafiado os pesquisadores com a necessidade de detectar os níveis de expressão de milhares de genes em um único experimento (54, 55).

Há muitas maneiras de medir os níveis de expressão gênica a partir dos transcritos, incluindo *Northern-blot*, análise em série da expressão gênica (SAGE) e RT-PCR, porém com exceção do SAGE, estas técnicas são inadequadas para os estudos de expressão de vários genes simultaneamente. Em relação ao SAGE, embora possa contribuir com a identificação de milhares de genes diferencialmente expressos em uma amostra, tem a desvantagem de ser uma técnica laboriosa, de alto custo e que demanda muito tempo. A expressão gênica usando microarranjos de DNA permite a análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo e tem sido aplicada com sucesso para avaliar diferentes processos celulares e teciduais em modelos animais e humanos. A disponibilidade comercial de lâminas contendo microarranjos de alta densidade permitiu um ganho significativo na qualidade, sensibilidade e reprodutibilidade dos dados obtidos possibilitando a detecção de pequenas alterações na expressão gênica que se traduzem em fenótipos celulares e teciduais significativos (56).

Embora a expressão gênica seja uma ferramenta que possa trazer um grande salto na compreensão dos mecanismos moleculares patológicos, nenhum trabalho empregando este tipo de abordagem havia sido realizado em pacientes com CLAR tipo II. Assim, pretende-se entender melhor as vias biológicas alteradas que contribuem para o fenótipo, aperfeiçoando, dessa maneira, o sistema de classificação destas síndromes complexas.



OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Neste contexto, nosso objetivo foi contribuir para o esclarecimento etiológico das síndromes raras CLAR tipo II, SPE e GO visando uma melhor caracterização das mesmas.

2. Objetivos específicos

- Investigar, nos indivíduos com sinais clínicos da CLAR tipo II e seus familiares, a presença de mutações nos genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1* e *PYCR1*, descrevendo as alterações eventualmente identificadas em tais genes.
- Identificar genes diferencialmente expressos associados a esta condição, a partir do estabelecimento de cultura de fibroblasto e pele fresca, utilizando técnica de microarranjos de DNA.



***CASUÍSTICA E
MÉTODOS***

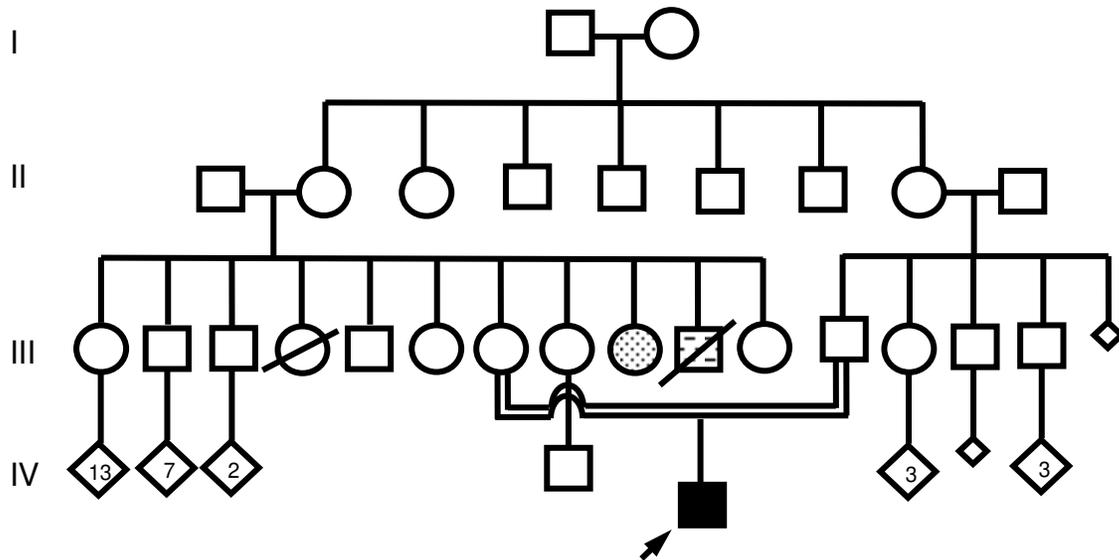
Este estudo segue os princípios éticos quanto à utilização de pesquisas envolvendo seres humanos, conforme preconizado pela legislação brasileira (resoluções 196/96, 251/97, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde), realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (409/2004) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, com a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos participantes (anexos 1 a 4).

O trabalho foi realizado em três indivíduos não aparentados, de ambos os gêneros, que apresentam quadro clínico típico de CLAR tipo II, SPE ou GO. Esses pacientes foram investigados no Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da FCM/Unicamp quanto a seus aspectos clínicos e foram previamente descritos na literatura (1, 17).

1. Indivíduo 1

O primeiro paciente é do sexo masculino, nascido a termo, de parto normal, após gestação sem intercorrências. É filho de pais jovens, saudáveis e consanguíneos (primos em primeiro grau), descendentes de portugueses, afro-brasileiros e ameríndios (Figura 2). Seu peso ao nascimento era 2.100 g, medindo 41 cm, perímetro cefálico de 29 cm (todos abaixo do terceiro percentil) e o índice de Apgar foi 7/8.

No primeiro exame clínico, aos 15 dias de vida, foi notada aparência facial senil. A pele era fina, com aparência idosa, especialmente no rosto e na região periorbitária, e se encontrava solta na nuca, tronco e extremidades. Excesso de pregas palmares e plantares, além de vasos sanguíneos superficiais, eram visíveis sob a pele fina. Outras características incluíram uma fronte alta, occipital proeminente, rosto triangular, orelhas antevertidas com hipoplasia leve de lóbulos auriculares, pregas epicânticas, esclera azul, nariz pequeno, micrognatia, filtro nasolabial longo, lábios finos, pescoço curto e diástase dos músculos abdominais. Os pulsos e as articulações interfalangeanas proximais estavam flexionados, permitindo extensão dolorosa, e os dedos eram longos. O tecido subcutâneo era escasso e solto.



Legenda: ■ propositus; ⊙ deficiência mental; □ sinais dismórficos não especificados.

Figura 2: Heredograma do paciente 1.

A evolução no primeiro ano de vida mostrou acentuação do aspecto senil e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor com hipotonia axial. Aos 17 meses de idade a fontanela anterior ainda estava aberta, medindo 4 x 6 cm, e uma hérnia inguinal também foi observada. Os dentes eram pequenos, amarelos e em forma de cone. Aos cinco anos de idade pesava 11.500 g e media 92 cm (ambos abaixo do terceiro percentil); perímetro cefálico de 51 cm (percentil 50), sugerindo macrocefalia relativa. O seguimento clínico revelou exacerbação da aparência senil, especialmente no dorso das mãos e pés, além da presença de hérnias inguinal e umbilical, testículos retráteis, gono valvo e pés planos. As veias proeminentes tornaram-se menos evidentes com a idade, porém o prognatismo se manteve presente. A mobilidade das articulações foi considerada normal e não havia desproporção entre os segmentos corporais. Havia relato de duas fraturas do antebraço direito depois de trauma. O paciente tem déficit cognitivo com hiperatividade e frequenta uma escola para crianças com necessidades especiais. Aos 19 anos de idade, o aspecto senil do rosto e mãos era significativo (figura 3).

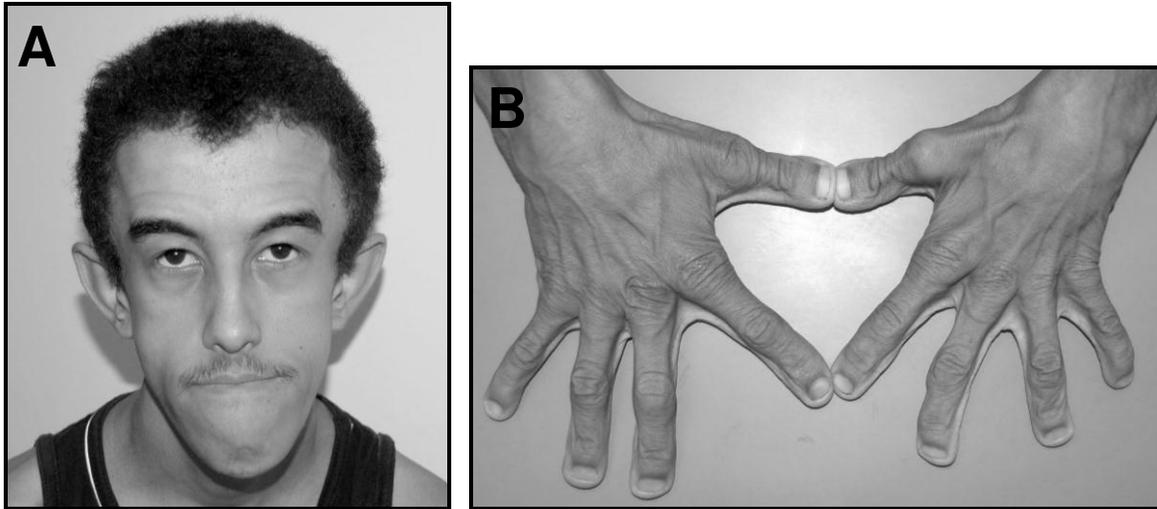


Figura 3: Paciente 1 com 19 anos de idade. (A) nota-se aspecto senil da face, frente ampla e prognatismo; (B) evidencia-se pele redundante no dorso das mãos, conferindo aspecto senil.

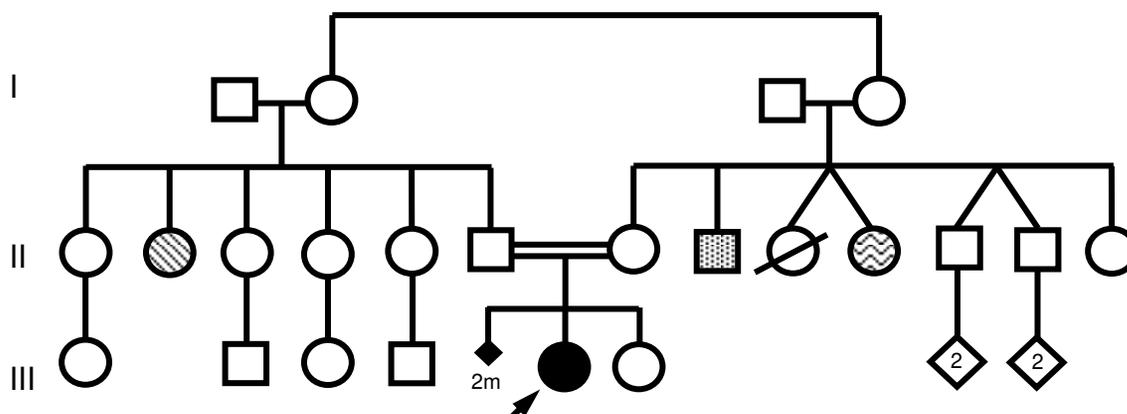
Os estudos complementares apresentaram-se normais e incluíram análise cromossômica com bandamento G em linfócitos do sangue periférico e resolução de 500 bandas, cromatografia de aminoácido, EEG, avaliação cardiológica e oftalmológica. O ecoencefalograma mostrou hidrocefalia leve e a cintilografia renal revelou função glomerular diminuída. Achados radiológicos incluíram escoliose, osteoporose, ossos Wormianos e divertículos vesicais evidenciados em exame de uretrocistografia. Não foi observada platispondilia até a última avaliação. O estudo histológico em uma amostra de pele revelou aumento da camada epidérmica e diminuição da espessura da derme, além de redução da quantidade, encurtamento e fragmentação de fibras elásticas.

O diagnóstico de CLAR tipo III foi inicialmente proposto, entretanto, com a evolução clínica, CLAR tipo II foi diagnosticado nesse indivíduo.

2. Indivíduo 2

O segundo paciente é do sexo feminino, nascida a termo por cesariana depois de uma gravidez sem intercorrências. É a segunda filha de pais

consanguíneos (primos em primeiro grau) descendentes de portugueses, afro-brasileiros e ameríndios (figura 4). O peso ao nascimento era 1.460 g, o comprimento foi 39 cm e o perímetro cefálico foi de 31 cm (todos abaixo do terceiro percentil).



Legenda: ● propósita; ⊗ “útero grudado”; ▣ epilepsia; ⊕ diabetes insulínica.

Figura 4: Heredograma do paciente 2.

No primeiro exame clínico, aos quatro meses de idade, apresentava aspecto envelhecido com cutis laxa sobre o tronco, nuca, pescoço e extremidades, além de pele fina e vasos sanguíneos proeminentes. Seu peso era 3.550 g, comprimento 52,5 cm e perímetro cefálico de 37 cm (todos abaixo do terceiro percentil). Ela também apresentou fronte alta, suturas cranianas abertas, orelhas dismórficas, nariz fino e pequeno, palato estreito e alto, assimetria de peito, fôvea coccígea, hérnias umbilical e inguinal à direita, hipoplasia de grandes lábios, hiperextensibilidade de pequenas articulações com posição anormal dos quirodáctilos (figura 5) e cabelo fino e esparsos. Aos seis meses de idade foi notada luxação de quadril e hipotonia muscular. A fontanela anterior fechou aos dois anos de idade.

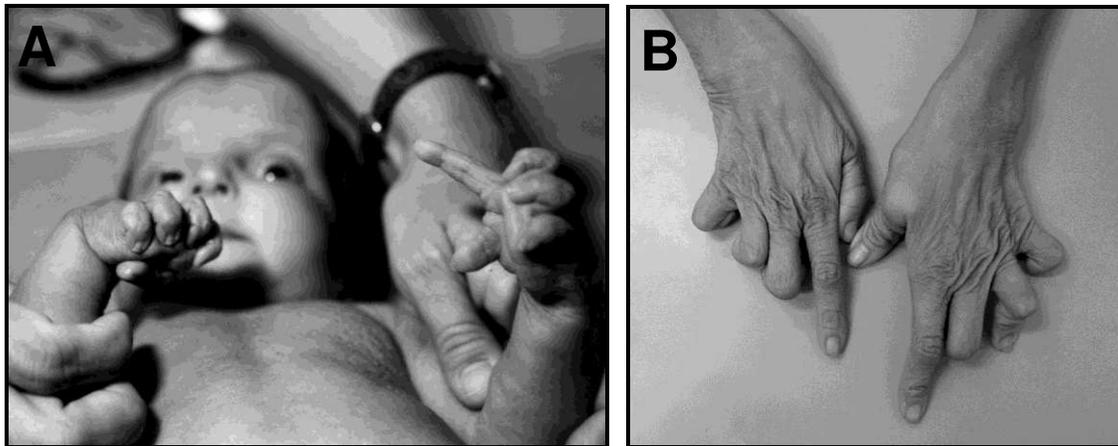


Figura 5: Paciente 2, observa-se mãos com posições anormais dos dedos. (A) aos quatro meses de idade e (B) aos 18 anos, com acentuação da pele redundante e aspecto senil.

Aos três anos de idade ela ainda não ficava em pé. Aos 10 anos apresentava baixa estatura e escoliose, lordose lombar e tônus muscular abdominal fraco (figura 6), sendo que o prognatismo tornou-se evidente e os dedos das mãos e dos pés ainda se mantinham em posição anormal. Assim como no paciente 1, apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizagem. A menarca ocorreu aos nove anos de idade, com ciclos regulares até o momento. Não apresenta nenhuma história de fraturas e nem desproporção de segmentos corporais. Atualmente a paciente encontra-se com 18 anos de idade.

Os estudos complementares apresentaram-se normais e incluíram análise cromossômica (linfócitos do sangue periférico, bandamento G e resolução de 500 bandas), cromatografia de aminoácidos, dosagem de hidroxiprolina urinária, ecoencefalografia, EEG, avaliação cardiológica e oftalmológica. Achados radiológicos incluíram escoliose, osteoporose, luxação bilateral do quadril, encurtamento proximal de rádios e ossos Wormianos, além de divertículos vesicais evidenciados à uretrocistografia. Não foi observada platispondilia até a última avaliação radiológica. O estudo histológico em uma amostra de biópsia de pele revelou aumento da camada epidérmica e diminuição da espessura da

derme, além de redução da quantidade, encurtamento e fragmentação de fibras elásticas.

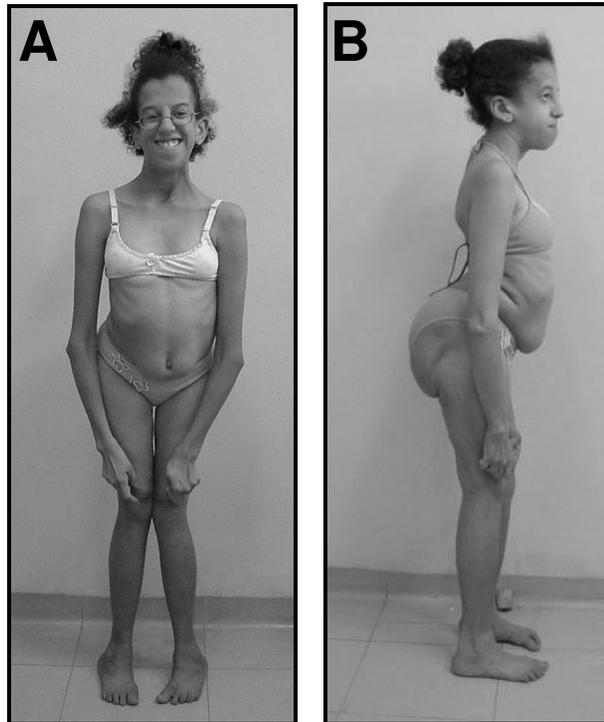
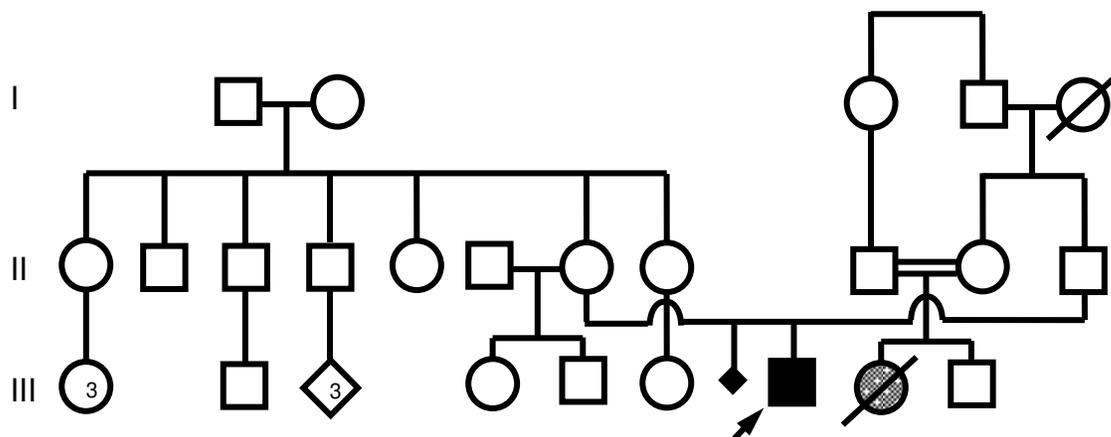


Figura 6: Paciente 2. Nota-se em (A) abdome proeminente, geno valgo e em (B) prognatismo e acentuação da lordose lombar.

Tal como no indivíduo 1, o diagnóstico de CLAR tipo III foi inicialmente proposto, entretanto, com a evolução clínica, CLAR tipo II foi diagnosticado nesse indivíduo.

3. Indivíduo 3

O terceiro paciente é do sexo masculino, tendo quatro anos e sete meses à avaliação inicial. Nasceu a termo após gestação sem intercorrências, único filho de um casal não consanguíneo de ancestralidade portuguesa, afro-brasileira e ameríndia, tendo um casal de meio-irmãos paternos, saudáveis. Nega casos semelhantes na família (figura 7).



Legenda: ■ propósito; ● deficiência mental, falecida por cardiopatia aos 24 anos.

Figura 7: Heredograma do paciente 3.

O peso ao nascimento foi de 2.400 g e o comprimento de 48 cm. Apresentou luxação congênita bilateral do quadril e, devido a aspecto senil, foi avaliado em outro serviço tendo sido dado diagnóstico da síndrome progeróide neonatal de Wiedemann-Rautenstrauch. Evoluiu com retardo no desenvolvimento neuropsicomotor. Ao exame clínico na primeira avaliação, apresenta peso de 9 kg, estatura de 85 cm e perímetro cefálico de 45,5 cm (todos abaixo do terceiro percentil). O exame dismorfológico revelou fronte abaulada com fontanelas de fechamento tardio, face triangular com hipoplasia malar e prognatismo, orelhas em abano, escleróticas azuladas (figura 8A), dentes pequenos e fracos, camptodactilia de 4º quirodáctilo à esquerda e testículo retrátil à esquerda. A pele era redundante no abdome e nas extremidades (figura 8B), com aumento do pregueamento e veias superficiais proeminentes, além de diminuição da gordura subcutânea.

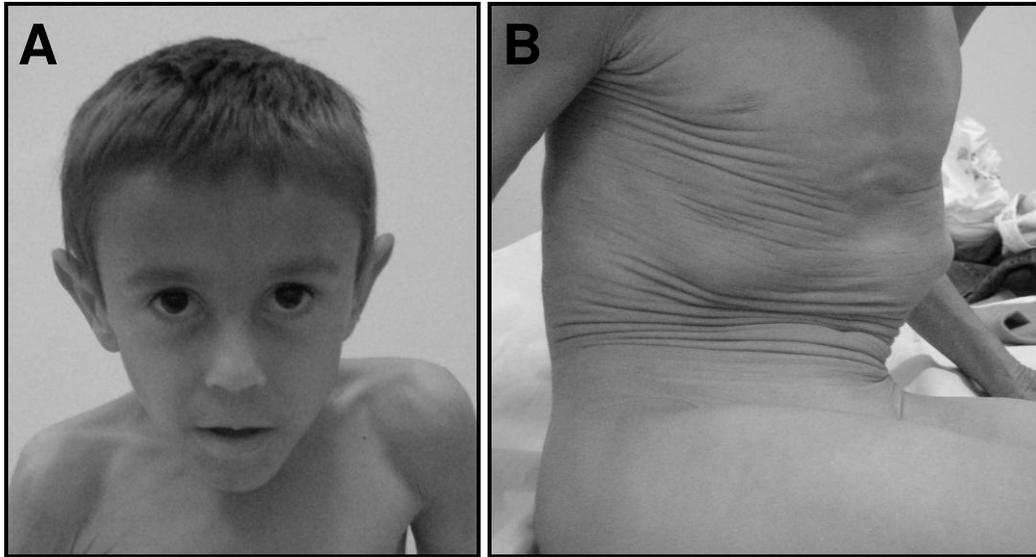


Figura 8: Paciente 3 aos quatro anos. Nota-se em (A) frente proeminente com face triangular e em (B) excesso de pele no abdome, produzindo o aspecto típico enrugado (“wrinkled”).

Estudos complementares incluíram cariótipo, ecocardiograma e avaliação oftalmológica, todos com resultados normais. O inventário radiológico mostrou osteopenia difusa e luxação bilateral do quadril. Não foi realizada pesquisa de divertículos vesicais por uretrocistografia.

O exame histológico corado pelo método de Weigert-van-Gieson, sob microscopia de luz, revelou redução da massa de fibras elásticas dérmicas. O exame ultraestrutural mostrou heterogeneidade na estrutura, quantidade e padrão de distribuição das fibras elásticas, comparativamente à pele-controle na mesma topografia, de indivíduo de mesma idade. Observaram-se áreas de aglutinação e fragmentação do componente microfibrilar e redução da massa relativa de elastina que, por vezes, foi mal corada ou globular (figura 9).

O diagnóstico de CLAR tipo II foi firmado para esse indivíduo.

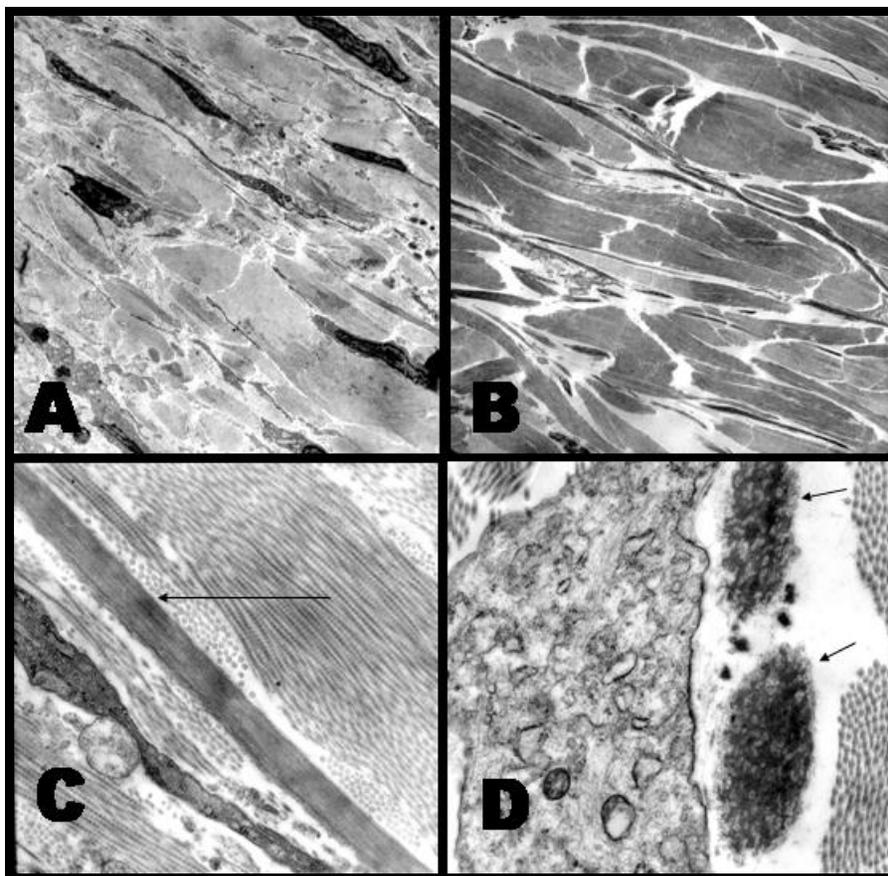


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão (ampliação original A: 3150x; B: 1670x; C: 20000x; D: 12500x). Cutis laxa, pele de tronco do indivíduo 3 (B e D). Pele de indivíduo controle pareado por sexo e idade (A e C). Diminuição da quantidade de fibras elásticas (B). Fragmentação e aglutinação do componente microfibrilar e elastina diminuído (D).

A tabela 5 apresenta, comparativamente, os achados de exame clínico entre os indivíduos 1 a 3 e outros da literatura, previamente revisados por Steiner et al. (1).

Tabela 5 - Principais características clínicas CLAR tipo II, SPE e GO (modificado de Steiner et al (1)).

Características Clínicas	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3	CLAR tipo II	SPE	GO
Gênero	M	F	M	11:19 (M:F)	5:9 (M:F)	16:10 (M:F)
Retardo de crescimento intra-uterino	+	+	+	19/22	7/10	6/16
Déficit de crescimento pós-natal	+	+	+	18/21	9/12	11/24
Desenvolvimento neuromotor atrasado	+	+	+	17/21	8/14	9/19
Hipotonia	+	+	-	9/10	10/14	4/6
Aparência senil	+	+	+	13/15	5/9	19/23
Pele solta	+	+	+	31/31	14/14	26/26
Vasos sanguíneos proeminentes	+	+	+	5/5	12/13	11/11
Dismorfismos crânio-faciais	+	+	+	26/26	10/14	23/24
Hérnia	+	+	-	9/10	2/2	10/11
Luxação do quadril	-	+	+	14/18	7/13	17/19
Frouxidão ligamentar	-	+	-	20/21	3/6	24/24

Legenda: Ind., indivíduo; +, presente; -, ausente; M, masculino; F, feminino.

Foram analisados, nos pacientes com CLAR tipo II e em seus genitores, os genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1* e *PYCR1*. Para tanto foram coletadas amostras de sangue periférico para obtenção de DNA genômico, o qual foi utilizado para amplificação e sequenciamento dos genes. Posteriormente, foram realizados estudos de expressão gênica de larga escala a partir de pele fresca e fibroblastos, conforme estratégia descrita a seguir.

4. Extração de DNA genômico de sangue periférico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 10 a 15 mL de amostras de sangue venoso, coletados em tubos *Vacutainer*[®], contendo EDTA 10% como anticoagulante, sendo realizada de acordo com o método descrito por Woodhead et al. (57), com modificações, como descrito abaixo.

As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, o plasma foi desprezado e as células sanguíneas foram transferidas para um tubo de polipropileno com fundo cônico. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1X (Tris pH 7,6 0,001M, KCl 0,0005M e MgCl₂ 0,001M) até completar um volume de 11 mL e 60 µL de Nonidet P40[®] (UBS Corporation, Cleveland, EUA) e, após homogeneização por inversão lenta (10 minutos), a amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. Três microlitros de solução SDS 10% pH 7.2 e 60 µL de proteinase K[®] (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha) (100 mg/mL) foram adicionados nas amostras, que foram incubadas a 37^o por aproximadamente 12h.

Após este período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol-clorofórmio, o qual permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se à amostra 3,0 mL de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizaram-se os tubos por inversão lenta por 10 minutos seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, descartou-se o precipitado da

solução. Esse processo foi repetido com 1,5 mL de fenol saturado e 1,5 mL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1, seguido de adição de 3,0 mL de uma solução clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1, centrifugou-se novamente a 2500 por 10 minutos em temperatura ambiente.

O DNA foi então precipitado ao se adicionar 6,0 mL de etanol absoluto gelado e, após inversão lenta do tubo, o DNA foi coletado com o auxílio de uma pipeta. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspendeu-se em um volume de 200 a 500 µL de TE 1X (TE 10X Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para que o DNA entrasse em solução.

Em seguida, essa amostra de DNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1X (TBE 10X é composto de Tris Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002M e em pH 8,0), e corado com brometo de etídeo na concentração final 0,5 µg/mL, a partir de uma solução estoque a 10 mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta, a fim de avaliar sua integridade.

5. Amplificação por PCR dos genes candidatos

Após a obtenção do DNA genômico deu-se início à amplificação das sequências correspondentes aos vinte éxons do gene *ATP6V0A2* (Ensembl, número de acesso ENSG00000185344 e ENST00000330342), incluindo a junção éxon-íntron, por meio da reação em cadeia da polimerase, PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Para tanto foram utilizados as sequências de 18 pares de *primers* descritos por Kornak et al. (44) e Huchtagowder et al. (45), apresentados na tabela 6.

Os éxons 10 e 11, assim como 12 e 13, apresentam-se agrupados. A sequência de *primers* utilizada para o éxon 15 foi desenhada com o auxílio do *software* GeneRunner™ versão 3.05 (Hastings Software Inc, Hastings, EUA).

Tabela 6 - Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *ATP6V0A2*.

Éxon	Sequência 5' → 3'	TA (°C)	Produto de PCR
1*	F - TGCAGTCTGGAGCCCCATAGTG R - TGTCATCTTCCCCGTCTGGACAA	63	398 pb
2*	F - AGGGTTGGGGTTTCACCGTGTT R - GGGTAACAACAAAATAACCAGGCCAT	60	526 pb
3 [#]	F - AGTCAGTTGGGACAAGCAAG R - GTTCACCACCACCTGGAAAG	56	494 pb
4*	F - ACCCACTGTTTTTGGTATACTGCAT R - AATACACAGCCTATGGGAATGAGAT	60	310 pb
5*	F - CCTCAGAAGTCTTTGCACCCAGAT R - TCCATTCATCCCTTCTATGGAGCT	60	302 pb
6 [#]	F - GGCTCTCAGGATGTCTTCACC R - TGAGATTCAAGGCTCAGGAC	59	487 pb
7 [#]	F - AGTGTTTGAGCTGCCGAAG R - AGAACTTGGCAGTGCAGC	58	295 pb
8 [#]	F - AGGTGCTTGTTGAGCATCTG R - GCCTTGTCATTACTACTCAGG	56	478 pb
9 [#]	F - TTAGCTGCCACCAGGATAGG R - CAGCTTTGAATGACCAGCTC	56	680 pb
10/11 [#]	F - GCAGTAACCCAGATTTCGTTG R - CGCAGCCTACAGCAAACATC	56	730 pb
12/13*	F - CTGAGAAGTGAGTGGTGAGG R - GCGTGAACCCTGCTCAACAGTCTA	60	698 pb
14 [#]	F - ACGCTATGTGGTTCCATCTG R - TGTCTCCCTCACTTGAATGG	57	659 pb
15	F - CTCGTAGATGTATCTGGACAC R - CCAACACTTCTACTGCTCAG	56	451 pb
16 [#]	F - ATGTTCCCTCGCGTGGAGAC R - CAAGAGACAGGGACCCTC	57	294 pb
17*	F - AGCCACTGTGCCTAGCCTAA R - CAGAAATCCCCTGGCGAAGTGA	60	491 pb
18 [#]	F - GCGTGTTCTTACCAGCATCC R - TCCACAGCACTCCTCAGC	57	436 pb
19 [#]	F - GAGCACCAGGTCTTCCTTAG R - CTCCTGACCTCACGTGATC	57	629 pb
20 [#]	F - TGAAGCAATTTTCAGCACAGG R - CTATCCCTACTTCAGCTGTTGG	59	632 pb

Legenda: F, *forward*; R, *reverse*; TA, temperatura de anelamento; pb, pares de bases; [#], primers descritos por Kornak et al. (44); *, primers descritos por Huchtagowder et al. (45).

Para a amplificação dos cinco éxons do gene *SCYL1BP1* (Ensembl, número de acesso ENSG00000120370 e ENST00000367763) pela técnica de PCR foram utilizados oligonucleotídeos anteriormente descrito por Hennies et al. (47) apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *SCYL1BP1*.

Éxon	Sequência 5' → 3'	TA (°C)	Produto de PCR
1	F – AGCCAGAGGAAACGAATGTC	58	409 pb
	R – TCCGCTAACACAAACGTAGC		
2	F – GAGAATGGGGTAGGAGAACCA	60	676 pb
	R – CATAACAGAATGCCTGTGTCC		
3	F – TGAAGTGCAGATGGGTTTCTT	59	324 pb
	R – CACATGACACAACCTGGTTACAGG		
4	F – TCCCACTCACATACCTGATTTTC	59	290 pb
	R – TACAGCACTGAATGGGGTTG		
5	F – TTCCAATTTTGGAGTTGAG	57	618 pb
	R – GGTCAGGGCATGATCTACTG		

Legenda: F, *forward*; R, *reverse*; TA, temperatura de anelamento; pb, pares de bases.

O gene *PYCR1* possui sete éxons (Ensembl, número de acesso ENSG00000183010 e ENST00000329875) e foi amplificado pela técnica de PCR com o auxílio dos *primers* descrito na tabela 8 desenhados com o auxílio do *software* GeneRunner™ versão 3.05 (Hastings Software Inc, Hastings, EUA).

Tabela 8 - Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *PYCR1*.

Éxon	Sequência 5' → 3'	TA (°C)	Produto de PCR
1	F – CCCTTCCCAGTCATTTCTTC	58	419 pb
	R – CCTGCAGAAGTGGAAAGAG		
2	F – CTTGCAGTGAGCCGAGATTG	58	254 pb
	R – CACTCCTGCCTCTCACAC		
3	F – CAACTCCAGCATTCTCTGTG	59	440 pb
	R – ATGGACGCAGTGCCTAGATG		
4	F – TCTAGGCACTGCGTCCATG	60	385 pb
	R – AGTCCACAGCCTTGGAG		
5	F – CAAGGCTGTGGGAACTGGAG	58	278 pb
	R – CCAGCCACTGTAGCACACAC		
6	F – CGTCAGTGTGTGCTACAGTG	57	328 pb
	R – GAATGAGCAGATGTGTGTGAG		
7	F – GGGAATAAAGGTGCTGAGG	57	448 pb
	R – CAGTGGGAAGTGATGTGGC		

Legenda: F, *forward*, R, *reverse*; TA, temperatura de anelamento; pb, pares de bases.

As reações de PCR consistiram em 0,2 µg de DNA genômico, 0,6 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,33 pmol de cada *primer*, 0,07 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA),

1,5 µl tampão de PCR 10X e 1,5 mM de MgCl₂ em volume final de reação de 15 µl. Os ciclos utilizados para amplificação dos fragmentos foram: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos que consistem em desnaturação a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (TA) específica para cada par de *primers* por 45 segundos, e extensão a 72°C por um minuto. Em seguida houve uma etapa de extensão final por cinco minutos a 72°C. A figura 10 representa os ciclos de amplificação utilizados de acordo com a TA de cada *primer*.

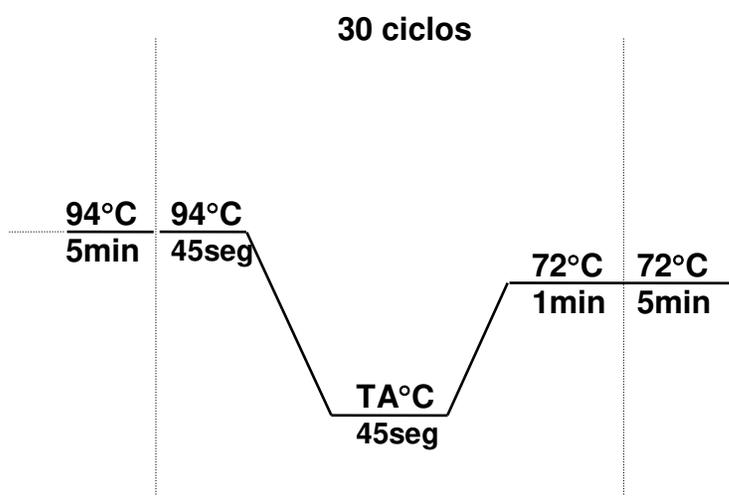


Figura 10: Ciclo de amplificação dos genes candidatos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão de TBE 1x e, após coloração com brometo de etídeo, o gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta e fotografado.

6. Purificação dos produtos de PCR

As amplificações por PCR que apresentavam fragmentos inespecíficos foram purificados para um melhor resultado na reação de sequenciamento. O procedimento consistiu em uma eletroforese do produto final da reação de PCR em um gel de agarose 2% preparado e migrado em TAE 1X (Tris-HCl 2M pH 8,0; Acido acético glacial; EDTA 0,5M pH 8,0) contendo brometo de etídeo.

Após a eletroforese, com o auxílio de um transiluminador, a região contendo o amplificado de interesse foi recortada do gel e submetida à purificação usando o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

7. Purificação Enzimática (*Exo-Sap*)

Antes das reações de sequenciamento, os fragmentos obtidos pela técnica de PCR foram purificados com a enzima *Exo-Sap* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as recomendações do fabricante, com o intuito de remover excesso de oligonucleotídeos e de nucleotídeos não incorporados que pudessem atrapalhar a qualidade da reação de sequenciamento. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos.

8. Reação de sequenciamento automático para produto de PCR

O sequenciamento do DNA foi realizado para identificação de mutações nos genes candidatos a partir do produto de PCR. O método utilizado-se para o sequenciamento foi o de terminação de cadeias (58, 59).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit de sequenciamento para MegaBACE 1000 DYEnamic ET (Amersham Biosciences, Amersham, UK) em volume final de 10 µL, compostos por 4 µL de “*pré-mix*”, 0,5 µmoles do *primer forward* ou *reverse* (os mesmos utilizados para reação de PCR), 40-80 ng do fragmento purificado e H₂O (q.s.p. 10 µL).

As condições de amplificação utilizadas consistiram em 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, TA°C por quinze segundos e 60°C por um minuto, e estão esquematizadas abaixo na figura 11.

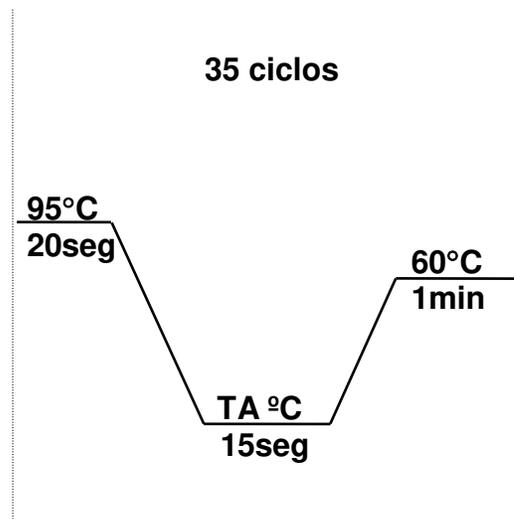


Figura 11: Ciclo utilizado na reação de sequenciamento automático.

A seguir, as amostras foram purificadas com acetato de amônio e etanol. Acrescentou-se, aos 10 μL da reação, 1 μL de acetato de amônio e 27,5 μL de etanol absoluto em um tubo de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 150 μL de etanol 70% e centrifugaram-se as amostras por 10 minutos a 4000 rpm. Descartou-se todo o etanol e as amostras secaram por duas horas em local escuro à temperatura ambiente. Antes das amostras serem submetidas ao equipamento MegaBaCE™ 1000 (Amersham Biosciences, Amersham, UK), estas foram eluídas em 10 μL de MegaBaCE Load Solution. Posteriormente, as amostras foram analisadas e comparadas com a sequência normal do gene com o auxílio do programa GeneRunner™ versão 3.05 (Hastings Software Inc, Hastings, EUA) e Chromas™ (Technelysiun Pty Ltd, Helensvale, QLD, Austrália).

É importante ressaltar que, nos casos em que foram detectadas alterações moleculares no sequenciamento, todos os experimentos foram repetidos, incluindo a amplificação do produto da PCR, para assegurar que o resultado não se tratava de um artefato de técnica.

As trocas de bases encontradas nos genes foram pesquisadas em banco de dados genéticos para verificação de descrições anteriores. O primeiro tipo de

banco utilizado foi de polimorfismos ou SNPs, principalmente o *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP)¹, para verificar se a alteração era comumente encontrada na população. O segundo tipo de banco pesquisado foi de mutações como o *Human Gene Mutation database* (HGMD)².

9. Análise de Restrição

Além da análise em banco de dados, para avaliar se a alteração não descrita na literatura p.Q10X no gene *PYCR1* poderia constituir um polimorfismo, foi estudado um grupo controle formado por 100 indivíduos não aparentados com os pacientes da pesquisa. Para tanto, foi utilizada a enzima de restrição *Bfa* I (Fermentas, Life Sciences, Vilnius, Lituânia) que reconhece um novo sitio de clivagem no fragmento do éxon 1 dividindo-o portanto, em três outros fragmentos, conforme observado na figura 12. Essa análise também foi utilizada para a identificação dos genitores dos indivíduos.

Considerando-se que indivíduos homocigotos normais devem apresentar apenas uma clivagem no fragmento de PCR, após a digestão enzimática deve haver dois fragmentos com tamanhos de 56 e 363 pb. Por outro lado, os indivíduos homocigotos para a alteração apresentam a substituição da base C para T no códon 10 devendo apresentar três fragmentos de tamanho diferentes, com 56, 106 e 257 pb. Os heterocigotos apresentam quatro bandas (56 pb, 106 pb, 257 pb e 363 pb).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

² <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

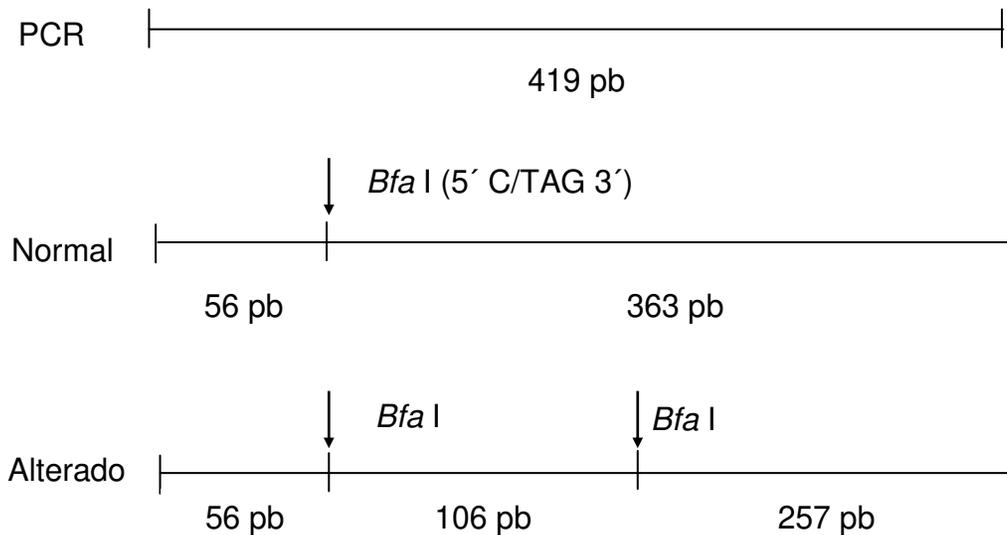


Figura 12: Representação esquemática da análise de restrição da alteração p.Q10X no gene *PYCR1*.

Neste contexto, os produtos de PCR foram digeridos com 0,5 U da enzima de restrição *Bfa*I em um volume final de 20 μ L, segundo o protocolo descrito pelo fabricante da enzima. As reações foram incubadas em banho a 37°C por 16h.

Após a incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de poliacrilamida 12% (3,0 mL de TBE 10x; 9,0 mL de poliacrilamida 40%; 17,79 mL de água ultra-pura estéril; 210,0 μ L de persulfato de amônio 10% e 35,0 μ L de TEMED) preparado e migrado em TBE 1X contendo brometo de etídeo, sendo então visualizados sob luz ultravioleta.

10. Análises *in silico*

Alterações não sinônimas, que causam substituição de um único aminoácido na sequência proteica, podem ou não alterar a função e a estrutura da proteína. O uso de algoritmos computacionais pode auxiliar na estimativa dessas alterações. Para a análise da alteração não sinônima encontrada foram utilizados os seguintes testes *in silico*: escala Grantham, PolyPhen, PolyPhen2, Panther, SNPs&GO e MutPred. Neste estudo, a aplicação desses testes *in silico* teve como

propósito simular o efeito na proteína de uma alteração encontrada no éxon 6 do gene *PYCR1* (p.A241V).

Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além de, no caso das análises de bioinformática, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas (60, 61).

Para verificar a conservação do aminoácido alterado na proteína, a sequência da proteína *PYCR1* humana³ (ID: P32322) foi comparada às sequências correspondentes em várias espécies, tais como orangotango (ID: Q5R9X6), coelho (ID: G1SG90), boi (ID: Q58DT4), cachorro (ID: E2QZ30), peixe paulistinha (ID: Q6P971), camundongo (ID: Q922W5) e rato (ID: B2RYR3), utilizando o programa de múltiplo alinhamento de sequências *clustalW*⁴ (62, 63).

Além dos seis testes *in silico* apresentados foi investigada ainda a estrutura proteica resolvida do *PYCR1* obtida a partir do banco de proteínas PDB⁵ (ID: 2GER) e analisada com o *software* livre *PyMol*⁶, versão 1.41. A mutação identificada foi introduzida por modelamento de proteína utilizando o servidor *Modwe*⁶. Os modelos gerados foram analisados quanto à distribuição espacial e às interações entre os aminoácidos utilizando a interface gráfica gerada pelo programa de acesso livre *STING Millennium*⁷ (suíte *BlueStar STING*) (64, 65).

11. Cultura e manutenção de fibroblastos

Para a padronização da técnica de cultura de fibroblastos, realizada no Laboratório de Cultura de Células da Pele/CIPED/FCM, Unicamp, foram utilizadas amostras residuais de procedimento cirúrgico (dermolipectomia e postectomia), fornecidas pelas equipes de cirurgia do Hospital Estadual de Sumaré (HES), após

³ <http://www.uniprot.org>

⁴ <http://align.genome.jp/>

⁵ www.pdb.org

⁶ <http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi>

⁷ www.cnptia.embrapa.br

autorização e assinatura do termo de consentimento específico pelo paciente submetido ao procedimento ou pelo responsável (66).

Após a padronização da cultura de fibroblastos, amostras de pele da região lombar de dois dos indivíduos da pesquisa e dois controles saudáveis pareados por sexo, idade e região topográfica anatômica foram coletadas usando um *punch* de 5 mm.

O material foi coletado em frascos cônicos estéreis contendo solução salina 0,9% com adição de antibiótico e antifúngico (penicilina sódica, estreptomicina e anfotericina B), na concentração 1:100/mL.

Em fluxo laminar, cada amostra de pele foi lavada com solução contendo antibiótico por várias vezes, para diminuir riscos de contaminação da cultura e para retirar excesso de sangue. As amostras foram separadas em derme e epiderme com auxílio de instrumental cirúrgico estéril e em seguida, repicadas em pequenos fragmentos com tesoura cirúrgica (explantes).

Após a adição de tripsina/EDTA 0,25%, as amostras foram incubadas a 37°C por até 3 horas, para dissociação das células. Posteriormente, a tripsina foi neutralizada com meio M199 com 20% de soro fetal bovino. Com o auxílio de pipeta misturou-se vigorosamente a solução para auxiliar na liberação das células e, em seguida, o material foi filtrado com filtro de nylon 40 µm para separação celular. O material residual da filtração das células após a fragmentação enzimática, assim como o explante, foram utilizados para iniciar a cultura de fibroblastos.

A suspensão celular obtida da filtração foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm, o *pellet* foi ressuspensionado no meio de cultura, e distribuído nos frascos de cultura de 25 cm³. Os frascos foram incubados a 37° C, com tensão constante de 5% CO₂. O meio utilizado para obtenção da cultura de fibroblastos foi o Medium 199 (M199, Gibco 31100-035), suplementado com L-glutamina 2 mM/mL, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL, soro fetal bovino 10% e Human FGF-basic 50 ng/ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA).

Os meios de cultura foram trocados duas a três vezes na semana, dependendo da confluência verificada no frasco. Quando as culturas

apresentaram confluência de cerca de 80% passavam a ser repicadas e subcultivadas em outros frascos, etapa considerada como primeira passagem da cultura. Para os ensaios foram utilizados fibroblastos entre as quarta e quinta passagens. Uma vez estabelecida a cultura, as células foram submetidas à extração de RNA.

12. Extração de RNA

A análise da expressão gênica foi realizada em células obtidas por meio de *punch* (5 mm) da região lombar de dois dos indivíduos da pesquisa e dois controles saudáveis pareados por sexo, idade e região topográfica anatômica, assim como de células da cultura de fibroblastos. A extração do RNA total das células foi realizada pelo reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) conforme o protocolo descrito pelo fabricante. O tecido foi macerado com o auxílio do aparelho *Polytron* em Trizol na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido macerado. Essa mistura foi homogeneizada e recebeu 200 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização por 15 segundos, incubou-se a mistura por três minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugou-se a mesma a 12000 G por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e adicionou-se 0,5 mL de isopropanol, incubando à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições. Removeu-se o sobrenadante e o RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 G por três minutos a 4°C. Após a retirada do etanol do tubo, este foi deixado para secar à temperatura ambiente por 10 minutos e o RNA foi ressuspendido em 20 µL de água *RNase-free*, posteriormente armazenados a 80°C.

A determinação da concentração e pureza do material foi realizada com o auxílio do aparelho *NanoDrop* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% preparado e migrado em TAE 1X (Tris-HCl 2M pH 8,0; Acido acético glacial; EDTA 0,5M pH 8,0), corado com SYBR Safe (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA).

13. Purificação do RNA

Seguindo recomendação da fabricante Affymetrix™ as amostras de RNA total foram purificadas adicionando-se 1:10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2,5 vezes o volume de etanol 100%. Em seguida, foram homogeneizadas e incubadas a -20°C durante uma hora. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C a 12000 G, com posterior remoção do sobrenadante, acréscimo ao *pellet* de 1 mL etanol 80% e nova centrifugação por 10 minutos a 4°C a 12000 G, repetindo-se este procedimento duas vezes. Logo após retirou-se o sobrenadante deixando evaporar todo resíduo de etanol. Finalmente, ressuspendeu-se o pellet em 10 µL água livre de *RNAse*.

14. Expressão gênica

Para a análise de expressão gênica foi usado o microarranjo de DNA (*chip*) humano completo: *Human Genome U133 Plus 2.0 Array* da Affymetrix™, que contém sondas para análise de 47.000 transcritos e variantes, de modo a cobrir todo o genoma. Além das lâminas mencionadas, foram usados os kits *3' IVT Express Kit Assay e Hybridization, Wash and Stain* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) para a obtenção do cDNA, cRNA, marcação, hibridização, detecção e lavagem, respectivamente. Para a leitura dos *chips* foi utilizado o *GeneChip Scanner 3000* instalado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas/SP.

14.1. Sistema Affymetrix

As sequências de cada *chip* são derivadas dos bancos de dados GenBank®, dbEST e RefSeq. Os dados completos, incluindo anotações das sequências e dos genes podem ser obtidos no NETAFFX™.⁸ A tecnologia empregada na produção dos *chips* envolve os processos de fotolitografia e

⁸ www.affymetrix.com/analysis/index.affx

química combinatória, permitindo assim a síntese específica dos oligonucleotídeos. É uma técnica que permite a produção simultânea de milhares de sondas de forma relativamente rápida. Esta técnica se utiliza de uma série de sondas (*probes*) para cada gene alvo, essas sondas são denominadas coletivamente como *probe-set*. Cada *probe-set* consiste em milhões de fitas simples de DNA de comprimento (25 pares de base) e sequências definidas, confinado a uma pequena área quadrada, que alinham com a sequência de um gene alvo (67).

O protocolo seguiu a recomendação do fabricante e está descrita a seguir.

14.2. Preparação dos alvos

Neste passo, uma dupla fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total purificado extraído das amostras. Para a síntese da primeira fita de cDNA preparou-se uma solução contendo 200 ng RNA total e 2 μ L do controle de RNA Poly-A devidamente diluído, ajustada para um volume final de 5 μ L com água livre de *RNase*. Após a preparação dessa solução acrescentou-se 4 μ L de *First-Strand Buffer Mix* e 1 μ L *First-Strand Enzyme Mix* e após homogeneização, incubou-se por duas horas a 42°C.

Para a síntese da segunda fita de cDNA foi adicionado ao produto da primeira fita 5 μ L de *Second-Strand Buffer Mix*, 2 μ L *Second-Strand Enzyme Mix* e 13 μ L água livre de *RNase*. A mistura foi então incubada por uma hora a 16°C, seguido por 10 minutos a 65°C.

A partir deste cDNA realizou-se uma reação de transcrição *in vitro* para a produção de cRNA marcado com biotina (aRNA). Para tanto, foram adicionados 4 μ L do reagente IVT *Biotin label*, 20 μ L do IVT *Labeling Buffer* e 6 μ L do IVT *Enzyme Mix*. A mistura foi homogeneizada e, posteriormente, incubada a 40°C por 16 horas.

Para a etapa seguinte, compreendendo a purificação da dupla fita de aRNA, foi usado o kit *Target Amplification, Labeling and Control*. Para tanto foram

acrescentados a reação de transcrição *in vitro* 10 μL de *RNA Binding Beads* e 50 μL de *aRNA Binding Buffer Concentrate*.

Os volumes finais das amostras foram transferidos para uma placa de 96 *wells*, onde acrescentou-se 120 μL de etanol 100%. Após breve mistura, agitou-se por dois minutos a 300-500 rpm. Posteriormente, realizou-se por meio de uma placa magnética a etapa de remoção das *beads* magnéticas, processo realizado durante 5 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 μL de *aRNA wash solution* em cada amostra agitando por um minuto a 700-900 rpm, repetindo esta etapa duas vezes, logo após retirou-se o sobrenadante agitando a placa por um minuto a 1000-1200 rpm para evaporar qualquer resíduo de etanol.

Adicionou-se 50 μL de *aRNA Elution Solution* pré-aquecido (50-60°C) em cada amostra agitando por três minutos a 1000-1200 rpm, após esta etapa, incubou-se na placa magnética por cinco minutos para que houvesse a captura das *beads* transferindo o sobrenadante para novos tubos.

Após estes passos, 1 μL do aRNA purificado foi utilizado para avaliar a quantidade e qualidade por espectrofotômetro, para tanto foi aferida a absorbância a 260 nm e 280 nm para se determinar a concentração e a razão $A_{260}:A_{280}$, que deverá ser maior que 1:8.

Desta reação, foram utilizados 15 μg de aRNA para fragmentação antes da hibridização. A reação foi realizada acrescentando ao aRNA 8 μL do tampão de fragmentação (5x), completando com água livre de *RNAse* para um volume final de 40 μL . Incubou-se a 94°C por 35 minutos. Uma alíquota foi utilizada para avaliar por meio de eletroforese em gel de agarose 2% a qualidade das amostras a serem hibridizadas.

14.3. Hibridização e detecção

Preparou-se um *cocktail* contendo o aRNA fragmentado e marcado com biotina aos controles de hibridização. Partindo de 12,5 μg de aRNA fragmentado foram adicionados 4,5 μL de oligonucleotídeo B2, 20 μL de controles de

hibridização, 25 µL de DMSO, 125 µL de tampão de hibridização 2x e 50 µL de água livre de *RNAse*, em um volume final de 250 µL. A mistura foi aquecida por 5 minutos a 99°C. Os *chips* foram previamente incubados com tampão de pré-hibridização por 10 minutos a 45°C em rotação constante. Então, transferiu-se a reação incubada a 99°C para um bloco a 45°C por 5 minutos. Removeu-se o tampão de pré-hibridização do *chip* e hibridizou-se com o *cocktail* em forno de hibridização mantido a 45°C numa rotação de 60 rpm por 16 horas.

14.4. Lavagem e detecção

Imediatamente após a hibridização, os *chips* foram colocados na estação fluídica para serem automaticamente lavados e marcados. Para isso soluções de estreptoavidina e anticorpo biotilado foram colocados na estação fluídica como indicado pelo manual para lavagem e detecção.

14.5. Aquisição das imagens e análise dos dados

As imagens de cada *chip* foram adquiridas com o *GeneChip Scanner 3000*. O *software* definiu cada célula do *chip* e computou a intensidade para cada uma destas células. Cada *chip* teve sua imagem armazenada em separado (em extensão .dat). A imagem foi analisada por intensidade e os resultados foram visualizados em formatos gráficos e tabulares. Os cálculos para a análise dos níveis de expressão e dos transcritos ausentes/presentes foram realizados com o pacote *Affy* e *RankProd* do Bioconductor em ambiente R⁹ (68-70).

A correlação e a interação de vias canônicas e de sinalização foram identificadas com o programa *Ingenuity Pathways Analysis*¹⁰ (IPA) versão 7.6. Este programa IPA baseia-se na identificação dos genes diferencialmente expressos e respectivos valores de *fold change* (FC) para gerar hipóteses das

⁹ <http://www.r-project.org>

¹⁰ www.ingenuity.com

interações entre as moléculas e vias de sinalização ativas ou inativas, fornecendo informação do contexto biológico das amostras analisadas.

A análise da representação gênica foi realizada pelo programa, *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID¹¹, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health*). DAVID é uma implementação *on-line* do *software* EASE que produz uma lista de categorias super-representadas usando um *score* designado para cada categoria pelo valor “-log” do *score* EASE (uma modificação do p-valor obtido através do teste Exato de Fisher) para demonstrar a significância de categorias de ontologia gênicas enriquecidas (71, 72). As categorias de ontologia gênicas relacionadas foram agrupadas em um *cluster* usando o módulo de clusterização funcional do DAVID. Os critérios de corte para determinação de enriquecimento foram *score* ≥ 3 e $p \leq 0.05$. Valores de enriquecimento maiores para um determinado *cluster* de genes refletem um aumento na confiança da análise de super-representabilidade.

15. PCR em tempo real

15.1. Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando 3,5U da enzima *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Um micrograma de RNA total de pele fresca e de fibroblastos foi incubado com 250 ng de oligos randômicos, 2 μ L de Tampão, 1 μ L de dNTP mix (10 mM) e água para um volume de 14 μ L, sendo as amostras incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 15 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C.

¹¹ <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>

15.2. Protocolo de PCR em tempo real

Levando em consideração a concentração do RNA foram selecionados quatro genes para a validação por PCR em Tempo Real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system), utilizando o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA), que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com um fluoróforo.

Foram utilizados ensaios otimizados e validados (Assays-on-DemandSM - Applied Biosystems) para os genes de interesse (*EZR*, Hs00185574_m1; *PALLD*, Hs00363100_m1; *S100A9*, Hs00610058_m1 e *SPRR2B*, Hs01595682_s1), os quais a empresa mantém em sigilo a sequência dos iniciadores. As sondas foram marcadas com o fluoróforo FAM.

Os genes escolhidos como controles endógenos para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras foram o *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *SDHA* (*Succinate dehydrogenase complex, subunit A*), sendo estes ensaios marcados com o fluoróforo VIC e também otimizados (Hs02758991_g1 e Hs00188166_m1, respectivamente) (73, 74).

Antes de iniciar os experimentos de quantificação relativa foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controlado endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes foram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo foi essencial para que o controle endógeno pudesse ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

A validação consiste na amplificação, tanto com os iniciadores do gene de interesse quanto do controle endógeno e dos cDNAs, em triplicatas de sete concentrações diferentes (diluições seriadas de cinco vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão, a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção). Nessa curva foram obtidos os valores da inclinação da curva (*slope*) e da confiabilidade das

réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do sistema foi calculada através da fórmula: $E=10^{(-1/slope)}-1$. Foram aceitas eficiência com variação entre 90 e 110%.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, são utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obtém-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta em que é possível verificar o valor da inclinação da mesma. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados. Portanto, a estimativa do número de transcritos foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (75).

Para a quantificação relativa dos genes selecionados, as reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em triplicata a partir de 6,25 μ L de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,625 μ L da solução de iniciadores e sonda, 1,625 μ L de água e 4,0 μ L de cDNA (50 ng), sendo que no controle negativo foram adicionados 4,0 μ L de água ao invés do cDNA, para um volume final de 12,5 μ L. As reações para o gene alvo e para o controle endógeno foram realizadas separadamente, na mesma placa (*singleplex*). Os reagentes, com exceção do cDNA, foram todos pipetados dentro de um fluxo laminar (livre de ácidos nucleicos), a fim de proteger os reagentes de contaminação de cDNA de experimentos anteriores. As condições de ciclagem para amplificações foram 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Em todos os experimentos, a expressão gênica

relativa foi calibrada pelo valor de expressão mais baixo observado nas amostras controle.



RESULTADOS

1. Gene *ATP6V0A2*

A amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *ATP6V0A2* (vinte éxons), foi realizada pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores (*primers*) descritos na tabela 6, que flanqueiam essas regiões. A figura nº 13 ilustra os produtos de amplificação dos éxons e suas respectivas junções íntron-éxon em eletroforese em gel de agarose 1,0 %.



Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,0% na qual foram testadas as amostras de PCR do gene *ATP6V0A2*. M- marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Todos os éxons amplificados do gene *ATP6V0A2* foram sequenciados nos três indivíduos e em quatro dos genitores. Com o auxílio do *software* GeneRunner™ versão 3.05 (Hastings Software Inc, Hastings, EUA), o gene foi analisado após amplificação com 18 pares de *primers* e os achados são mostrados a seguir.

A alteração intrônica IVS1-15 C>T foi observada em heterozigose nos indivíduos 2 e 3 e em homozigose TT no indivíduo 1 (figura 14). Esta alteração foi previamente relatada no banco de dados de polimorfismos (SNP, rs1139320).

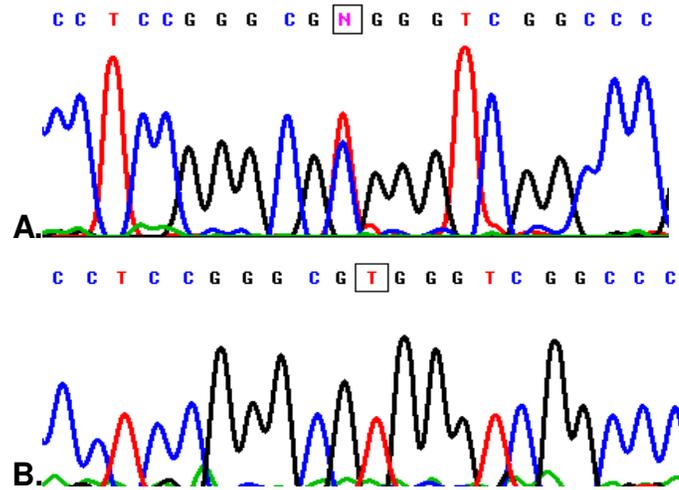


Figura 14: Eletroferograma mostrando a alteração IVS1-15 C>T do gene *ATP6V0A2*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto TT.

A figura 15 demonstra uma alteração pontual na região intrônica IVS3+103 C>T em heterozigose nos indivíduos 1 e 3 e em homozigose TT no indivíduo 2 (SNP, rs7301641).

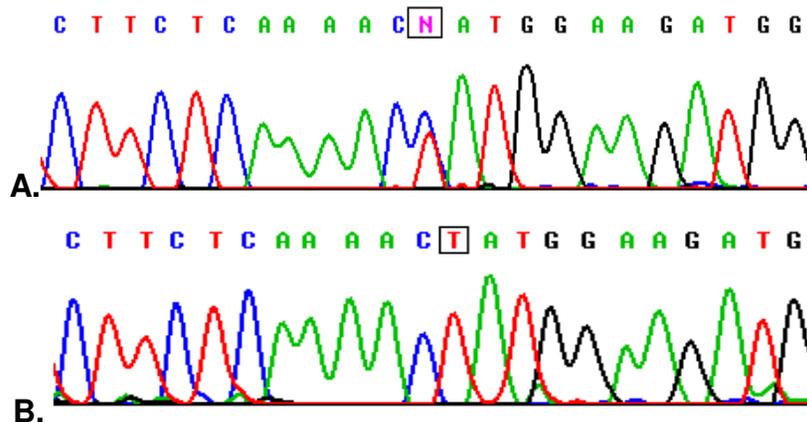


Figura 15: Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+103 C>T do gene *ATP6V0A2*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto TT.

A alteração IVS3+214 C>T foi observada nos indivíduos 1 e 3 em heterozigose e no indivíduo 2 em homozigose CC (SNP, rs9788204) (figura 16).

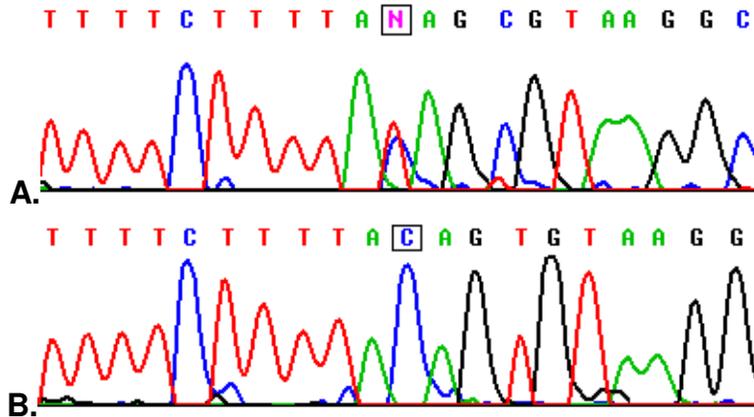


Figura 16: Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+214 C>T do gene *ATP6V0A2*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto CC.

No íntron 3 foi encontrada também a alteração IVS3+217 T>C, sendo os indivíduos 1 e 3 homozigoto CC e o indivíduo 2 homozigoto TT (SNP, rs9787987) (figura 17).

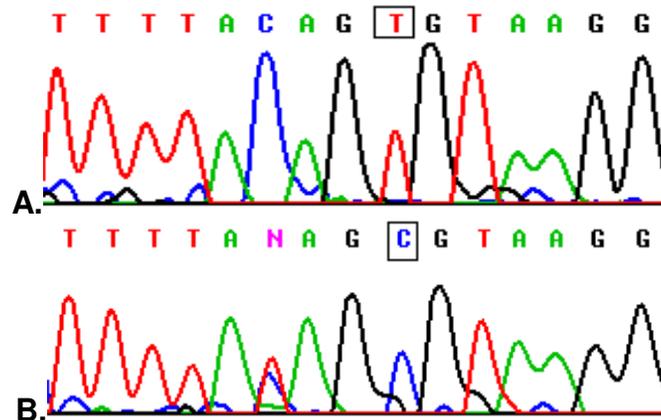


Figura 17: Eletroferograma mostrando a alteração IVS3+217 T>C do gene *ATP6V0A2*. A. sequência homozigoto TT, B. homozigoto CC.

Foi encontrada, uma troca de base 142 AACC>AAT (p.N142N) no éxon 4 nos indivíduos 1 e 3, em heterozigose (SNP, rs1139789) (figura 18). Tal substituição conserva o aminoácido asparagina, tratando-se de uma mutação silenciosa. O indivíduo 2 apresentou-se homozigoto TT.

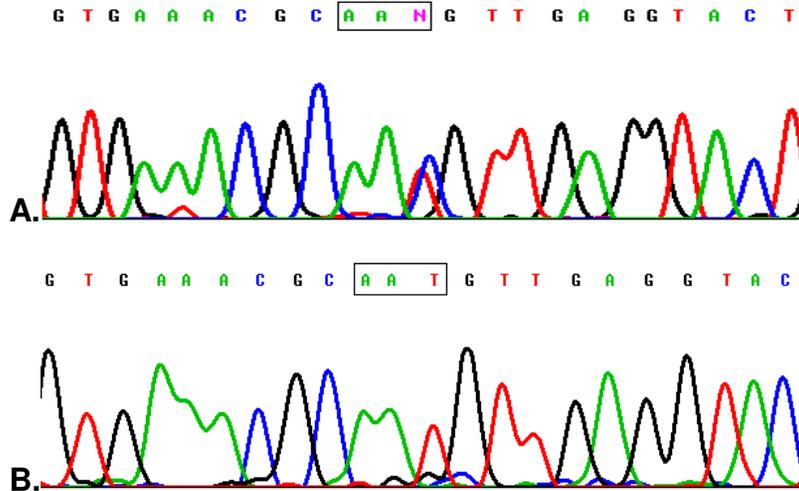


Figura 18: A. Eletroferograma demonstrando a alteração p.N142N em heterozigose no gene *ATP6V0A2*; B. homozigoto. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 142.

No íntron 4 foi encontrada a alteração IVS4+14 C>T, sendo o indivíduo 2 homozigoto CC e os indivíduos 1 e 3 heterozigotos CT (SNP, rs11837144) (figura 19).

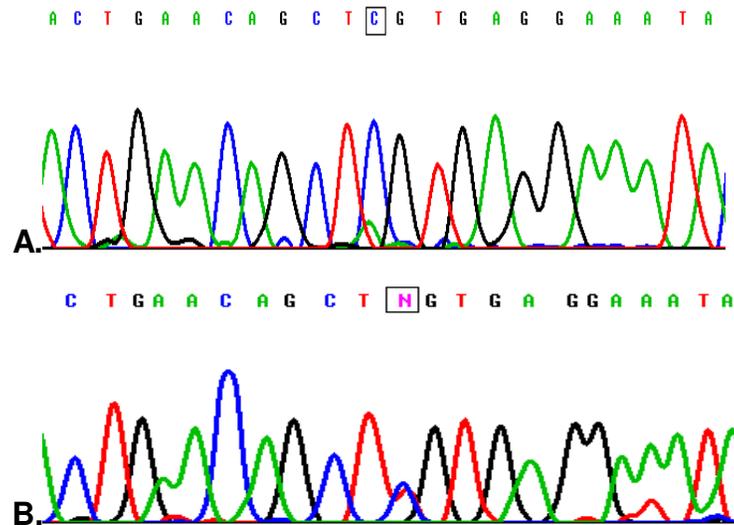


Figura 19: Eletroferograma mostrando a alteração IVS4+14 C>T do gene *ATP6V0A2*. A. sequência homozigota CC, B. Heterozigoto.

A alteração IVS5-195 C>T foi observada nos indivíduos 1 e 3 em heterozigose e no indivíduo 2 em homozigose CC (SNP, rs882563) (figura 20).

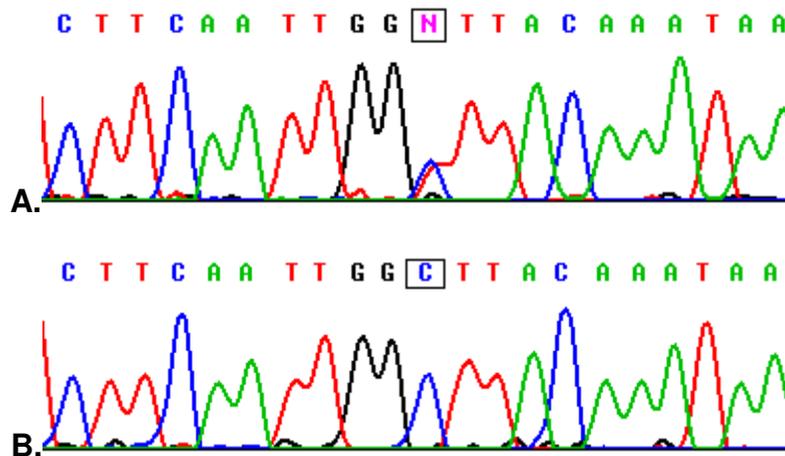


Figura 20: Eletroferograma mostrando a alteração IVS5-195 C>T do gene *ATP6V0A2*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto CC.

Nos indivíduos 1 e 3 foi identificada uma alteração no éxon 15 (AGT>AGC) em heterozigose (códon 157), porém essa variante não altera a sequência de aminoácido, conservando o aminoácido serina. A mesma não foi observada no paciente 2 (SNP, rs1399961) (figura 21).

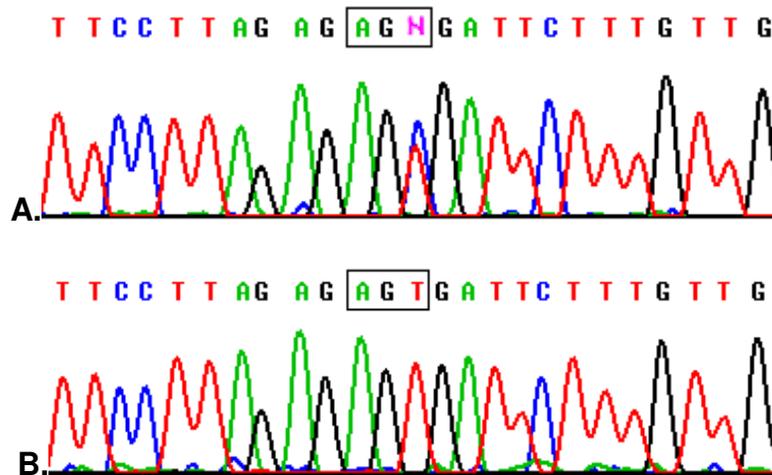


Figura 21: A. Eletroferograma demonstrando a alteração p.S157S em heterozigose no gene *ATP6V0A2*; B. homozigoto TT.

A alteração IVS8-23 T>C no íntron 8 foi observada nos indivíduos 1 e 3 em heterozigose e no indivíduo 2 em homozigose TT (SNP, rs2271660) (figura 22).

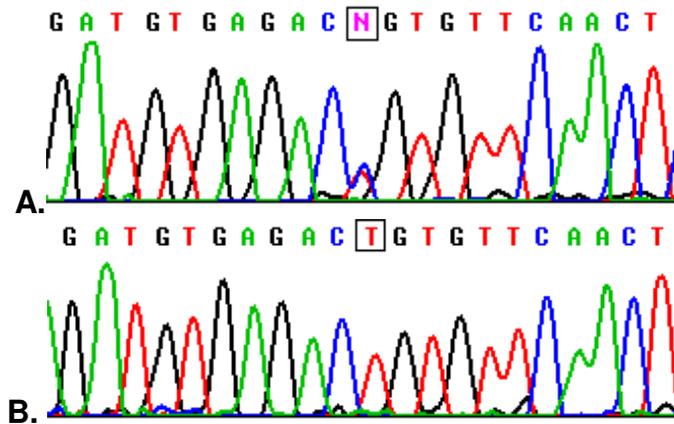


Figura 22: Eletroferograma mostrando a alteração IVS8-23 T>C do gene *ATP6V0A2*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto TT.

No primeiro nucleotídeo do éxon 13 correspondendo ao último aminoácido códon 505 (AAT>AAC) foi identificada uma alteração pontual nos indivíduos 1 e 3 em heterozigose, porém essa variante não altera a sequência de aminoácido, conservando o aminoácido asparagina. A mesma foi observada em homozigose no paciente 2 (SNP, rs7135542) (figura 23).

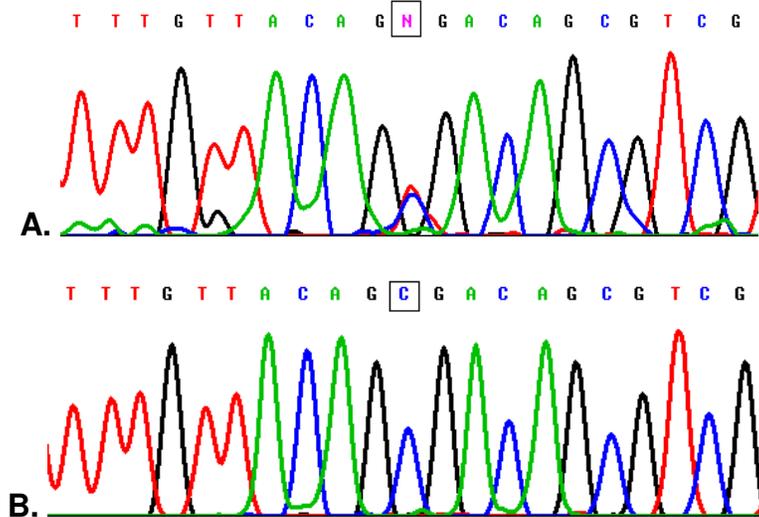


Figura 23: A. Eletroferograma demonstrando a alteração do aminoácido p.N505N em heterozigose no gene *ATP6V0A2*; B. homozigoto CC.

Foi encontrada ainda no gene *ATP6V0A2* uma alteração pontual no éxon 19 em heterozigose no indivíduo 1. Essa alteração consiste na troca do segundo nucleotídeo do códon 813 (C>T), modificando a trinca GCG, que corresponde ao aminoácido alanina pela trinca GTG, correspondente ao aminoácido valina (SNP, rs17883456) (figura 24). Os indivíduos 2 e 3 apresentam-se como homozigotos CC.

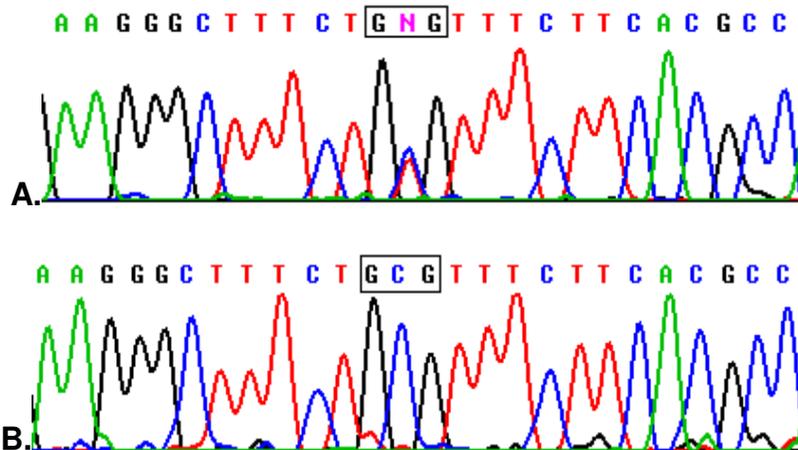


Figura 24: A. Eletroferograma demonstrando a alteração p.A813V em heterozigose no gene *ATP6V0A2*; B. homozigoto CC. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 813.

Resumindo, foram detectadas 11 alterações no gene *ATP6V0A2* e após pesquisa nos banco de dados, todas tratam-se de polimorfismos comuns na população geral.

2. Gene *SCYL1BP1*

A amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *SCYL1BP1* (5 éxons), foi realizada pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores (*primers*) descritos na tabela 7, que flanqueiam essas regiões. A figura 25 ilustra os produtos de amplificação dos éxons e suas respectivas junções íntron-éxon em eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

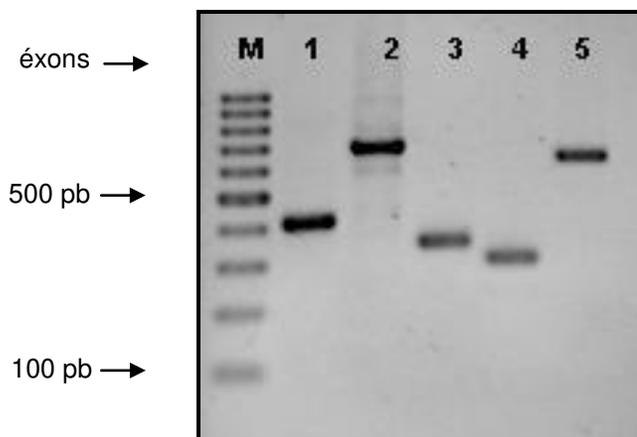


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 1,0% no qual foram testados os produtos da amplificação do gene *SCYL1BP1* por PCR. M- marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A análise dos sequenciamentos mostrou algumas alterações descritas anteriormente em banco de dados de polimorfismos nas sequências dos éxons 1 e 5, e no íntron 3. Os resultados desses sequenciamentos são apresentados nas figuras 26, 27 e 28.

A alteração GGA>GGC no códon 32 no éxon 1 foi identificada no gene *SCYL1BP1* nos três indivíduos em homozigose CC, sendo que essa variante conserva o aminoácido glicina (SNP, rs7531125) (figura 26).

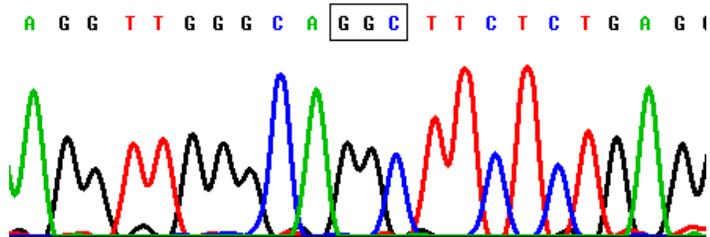


Figura 26: Eletroferograma demonstrando a alteração p.G32G em homozigose no gene *SCYL1BP1*.

No íntron 3 do gene *SCYL1BP1* foi observada a alteração IVS3-28 C>T, sendo o indivíduo 2 heterozigoto, os indivíduos 2 e 3 homozigotos TT (SNP, rs7538037) (figura 27).

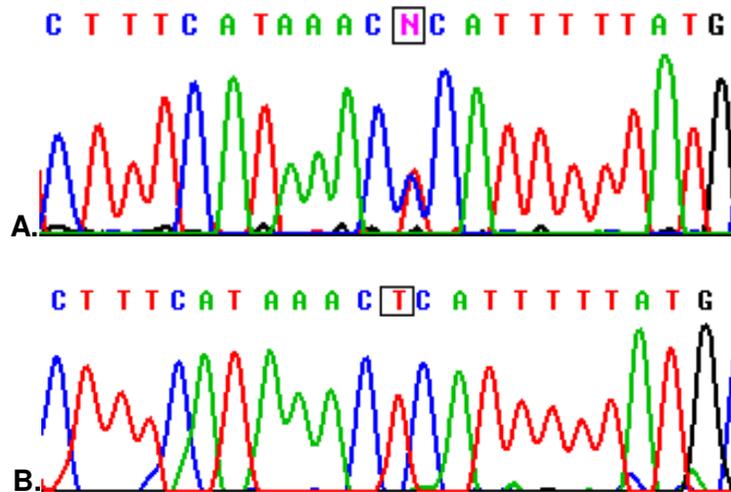


Figura 27: Eletroferograma mostrando a alteração IVS3-28 T>C do gene *SCYL1BP1*. A. sequência heterozigota, B. homozigoto TT.

Também foi observada uma alteração pontual no éxon 5 em homozigose nos indivíduos 1 e 2. Essa alteração consiste na troca do primeiro nucleotídeo do códon 320 (G>A), modificando a trinca GAA, que corresponde ao aminoácido ácido glutâmico pela trinca AAA, correspondente ao aminoácido lisina (SNP, rs913257) (figura 28). O indivíduo 3 apresenta a alteração em heterozigose.

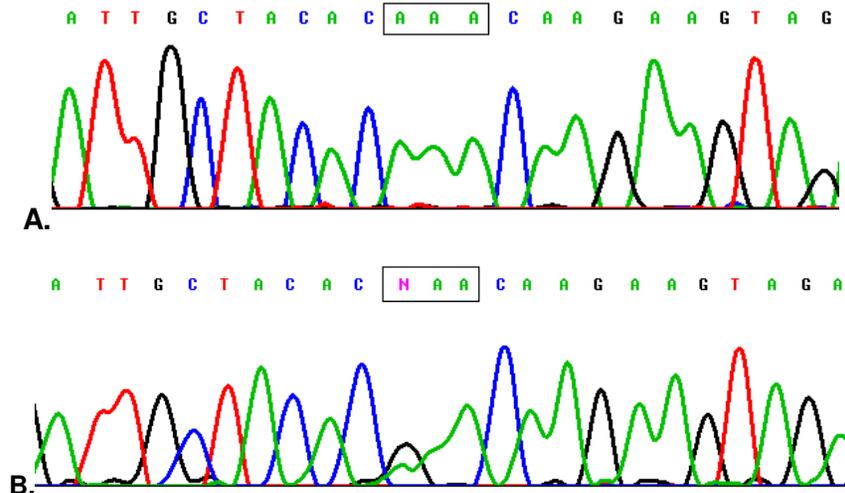


Figura 28: A. Eletroferograma demonstrando a alteração p.E320K em homozigose no gene *SCYL1BP1*; B. Heterozigoto GA. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 320.

3. Gene *PYCR1*

Os sete éxons do gene *PYCR1* foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos descritos na tabela 8. A figura nº 29 ilustra o resultado das ampliações dos éxons e suas respectivas junções íntron-éxon em eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

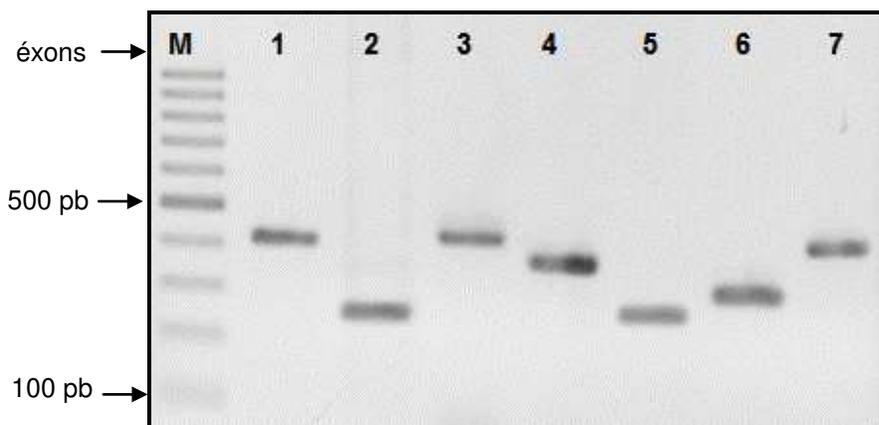


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 1,0% na qual foram testadas as amostras de PCR dos sete éxons do gene *PYCR1*. M- marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Os fragmentos seletivamente amplificados do gene *PYCR1* foram inteiramente sequenciados com o intuito de se esclarecer o genótipo de cada indivíduo. As análises revelaram três alterações, incluindo duas mutações inéditas e um polimorfismo previamente descrito em banco de dados de SNP.

A alteração pontual p.Q10X foi identificada no gene *PYCR1*, éxon 1 em homozigose nos indivíduos 1 e 2, os quais apresentam pais consanguíneos. Essa alteração consiste em uma substituição do primeiro nucleotídeo do códon 10 (C→T), modificando a trinca CAG, que corresponde ao aminoácido glutamina pela trinca TAG, criando um códon finalizador, designando o término da tradução do mRNA neste ponto, e resultando na perda de 310 aminoácidos (figura 30). Essa alteração não foi observada no terceiro paciente e não está relatada na literatura ou em qualquer banco de dados.

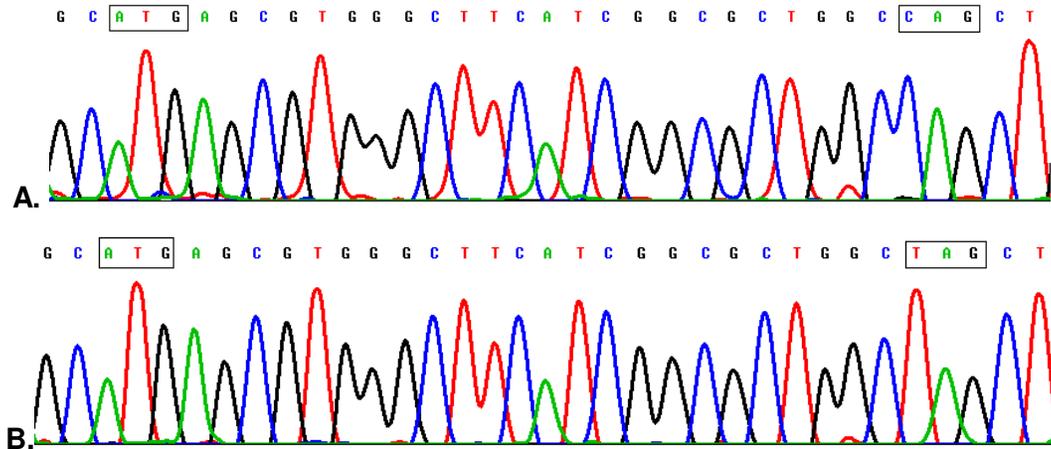


Figura 30: A. Eletroferograma mostrando o códon de iniciação (ATG) no retângulo esquerdo e a trinca de nucleotídeos correspondente ao códon 10 no retângulo direito; B. alteração p.Q10X em homozigose no gene *PYCR1*.

Uma vez que a alteração p.Q10X pode ser detectada por análise de restrição usando a enzima *Bfa* I, 100 voluntários não aparentados e sem evidências da doença foram estudados, sendo que todos foram identificados com o genótipo selvagem. Os pais do indivíduo 2 apresentaram a mutação em heterozigose, o que ocorreu também para a mãe do indivíduo 1 (o genótipo paterno do indivíduo 1 não foi analisado) (figura 31).

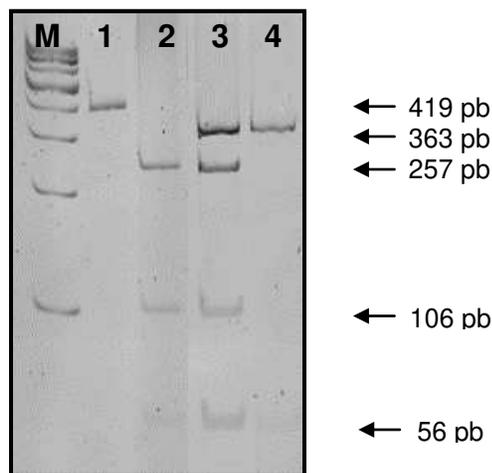


Figura 31: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na qual foram testadas as análises de restrição para a mutação p.Q10X no gene *PYCR1* com a enzima *Bfa* I. M- marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1- Fragmento sem digestão enzimática, 2- homozigoto para mutação, 3- heterozigoto e 4- homozigoto selvagem.

Além do estudo realizado por análise de restrição enzimática para averiguar se a alteração p.Q10X no gene *PYCR1* não se tratava de um polimorfismo foi realizado a tradução e alinhamento dos 319 aminoácidos da proteína pelos programas Translate e SIM+LALNVIEW¹², demonstrado na figura 32.

```

Wt      - MSVGFIGAGQLAFALAKGFTAAGVLAAHKIMASSPDMDLATVSALRKMVGKLTTPHNKETV
p.Q10X - MSVGFIGAG-
          *****

Wt      - QHSDVLF LAVKPHIIPFILDEIGADIEDRHIVVSCAAGVTISSIEKKLSAFRPPAPRVIRC
p.Q10X -

Wt      - MTNTPVVVREGATVYATGTHAQVEDGRLMEQLLSSVGFCTEVEEDLIDAVTGLSGSGPAY
p.Q10X -

Wt      - AFTALDALADGGVKMGLPRRLAVRLGAQALLGAAKMLLHSEQHPGQLKDNVSSPGGATIH
p.Q10X -

Wt      - ALHVLESGGFRSLLINAVEASCIRTRELQSMADQEQVSPAAIKKTILDKVKLDS PAGTAL
p.Q10X -

Wt      - SPSGHTKLLPRSLAPAGKD- p.319
p.Q10X -                      - p.09

```

Figura 32: Alinhamento dos aminoácidos do gene *PYCR1* comparando os tipos selvagem e mutante Wt, sequência proteica normal; *, síntese de proteína.

Foi identificada também uma alteração pontual no éxon 6 em homozigose no indivíduo 3. Essa alteração consiste numa substituição do segundo nucleotídeo do códon 241, modificando a trinca GCC, que corresponde ao aminoácido alanina pela trinca GTC, correspondente ao aminoácido valina (figura 33). A alteração p.A241V não foi observada nos indivíduos 2 e 3, apresentado alelos selvagens em homozigose. A mãe do indivíduo 3 apresenta a mutação em heterozigose, (o genótipo paterno do indivíduo 3 não foi analisado). Essa alteração não está relatada na literatura ou banco de dados.

¹² <http://www.expasy.org>

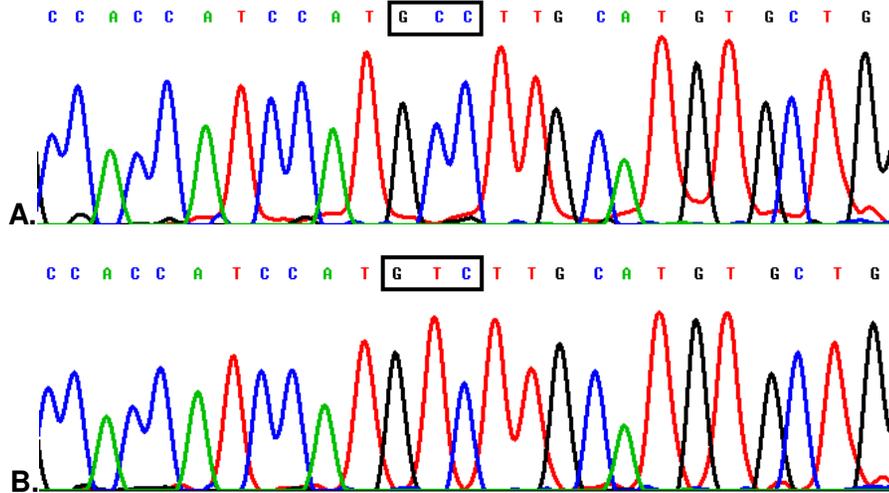


Figura 33: A. Eletroferograma demonstrando homocigoto CC no gene *PYCR1*; B. alteração p.A241V em homocigose. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 241.

Para investigar se a alteração p.A241V não se tratava de um polimorfismo foi investigado por sequenciamento direto 100 voluntários não aparentados e sem evidências da doença, sendo todos identificados com o genótipo selvagem.

Diante de resultados como estes é importante a aplicação de testes *in silico* para prever qual o impacto da alteração p.A241V sobre a estrutura e função proteica e, assim, poder inferir se há uma associação ou não desta alteração com o fenótipo da doença. Com esse objetivo foram aplicados testes que combinados fornecem importantes previsões do quanto essa alteração pontual pode ser deletéria. Os testes aplicados, como descritos anteriormente, foram a escala Grantham e os algoritmos PolyPhen, PolyPhen2, Panther, SNPs&GO e MutPred. A Tabela 9 mostra os resultados das análises de previsão do efeito dessa alteração na proteína e os valores calculados por cada ferramenta utilizada.

Tabela 9 - Resultados das análises de predição do efeito da alteração p.A241V na proteína.

Ferramenta	Valor	Predição
Escala Grantham	64	Troca conservativa (51-100)
PolyPhen	2.155	Provavelmente prejudicial (>2.00)
PolyPhen2	1.00	Provavelmente prejudicial (valor máximo 1)
Panther	-4.00123	Substituição deletéria (<-3)
SNPs&GO	RI 5	Associado à doença
MutPred	g.0,877/p.0,034	Associado à doença

Legenda: RI, índice de confiabilidade da previsão (pontuando de 0 para pouco confiável a 10 confiável); g, probabilidade de que a substituição do aminoácido seja deletéria; p, confiabilidade dos resultados (pontuações com $g > 0,75$ e $p < 0,05$ são referidos como hipóteses confiante).

O alinhamento comparando a sequência da proteína humana PYCR1 com a mesma proteína de diferentes espécies indicou o aminoácido p.A241 como um resíduo altamente conservado (figura 34), o que sugere que a troca de aminoácido nesta região deve causar prejuízos na função biológica da proteína PYCR1.

	241	
Homo sapiens (Human)	...MLLHSEQHPGQLKDNVSSPGGATIH	p. 319
Pongo abelii (S. orangutan)	...MLLHSEQHPGQLKDNVSSPGGATIH	p. 319
Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	...MLLDSEQHPGQLKDNVCSPPGGATIH	p. 284
Bos taurus (Bovine)	...MLLDSEQHPGQLKDNVCSPPGGATIH	p. 320
Canis familiaris (Dog)	...MLLDSEKHPGQLRDNVCSPPGGATIH	p. 320
Danio rerio (Zebrafish)	...MLLESEQHPGQLKDNVSPGGATIH	p. 320
Mus musculus (Mouse)	...MLLDSEQHPGQLKDNVCSPPGGATIH	p. 309
Rattus norvegicus (Rat)	...MLLDSEQHPGQLKDNVCSPPGGATIH	p. 285

Figura 34: Alinhamento das sequências de proteína do gene *PYCR1* em diferentes espécies. O aminoácido 241 está representado em cinza.

Os contatos internos realizados pelo resíduo A241 na proteína PYCR1 foram analisados e comparados com os contatos realizados pelo resíduo alterado V241. O aminoácido alanina na posição 241, resíduo normal, apresenta cinco interações do tipo pontes de hidrogênio de cadeia principal com os resíduos A237,

T238, H243, V244 e L245 e duas interações hidrofóbicas com os resíduos, V244 e L245.

O resíduo mutante valina na posição 241 mantém as pontes de hidrogênio com os resíduos A237, T238 e V244 e perde suas interações de ponte de hidrogênio de cadeia principal com os aminoácidos H243 e L245 e a interação hidrofóbica com L245. Além disso, na proteína mutante uma nova interação hidrofóbica é estabelecida com o resíduo T238 (figura 35).

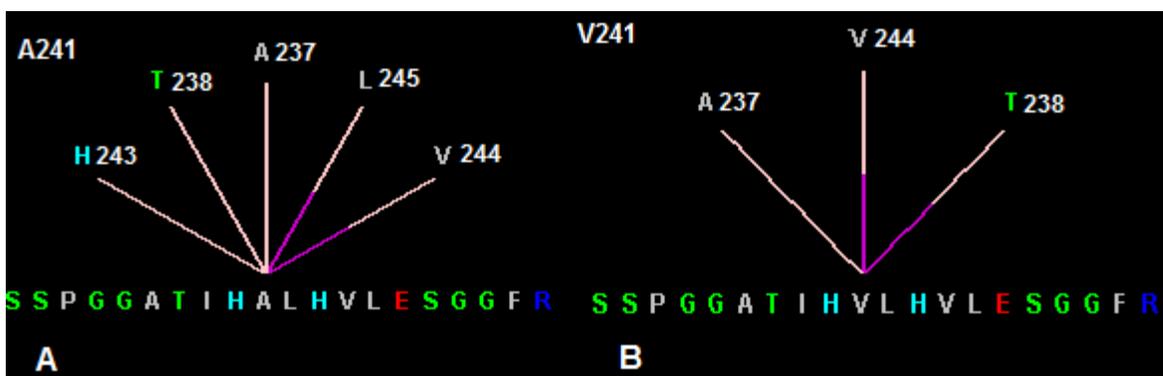


Figura 35: Gráfico de contatos internos (fornecido pelo programa *STING Report*) verificando o efeito das novas interações estabelecidas entre os aminoácidos alanina e valina. (A) resíduo normal, A241, (B) mudança no padrão de interações com outros aminoácidos na proteína PYCR1 alterada, apresentando o aminoácido valina na posição 241. Rosa, pontes de hidrogênio de cadeia principal; roxo, interações hidrofóbicas.

Na figura 36, observa-se a estrutura tridimensional da proteína PYCR1 mutante V241 sobreposta à proteína normal, ambas modeladas utilizando a proteína humana do PYCR1 previamente publicada (PDB- ID: 2GER), onde a diferença estrutural entre os aminoácidos é evidente (65).

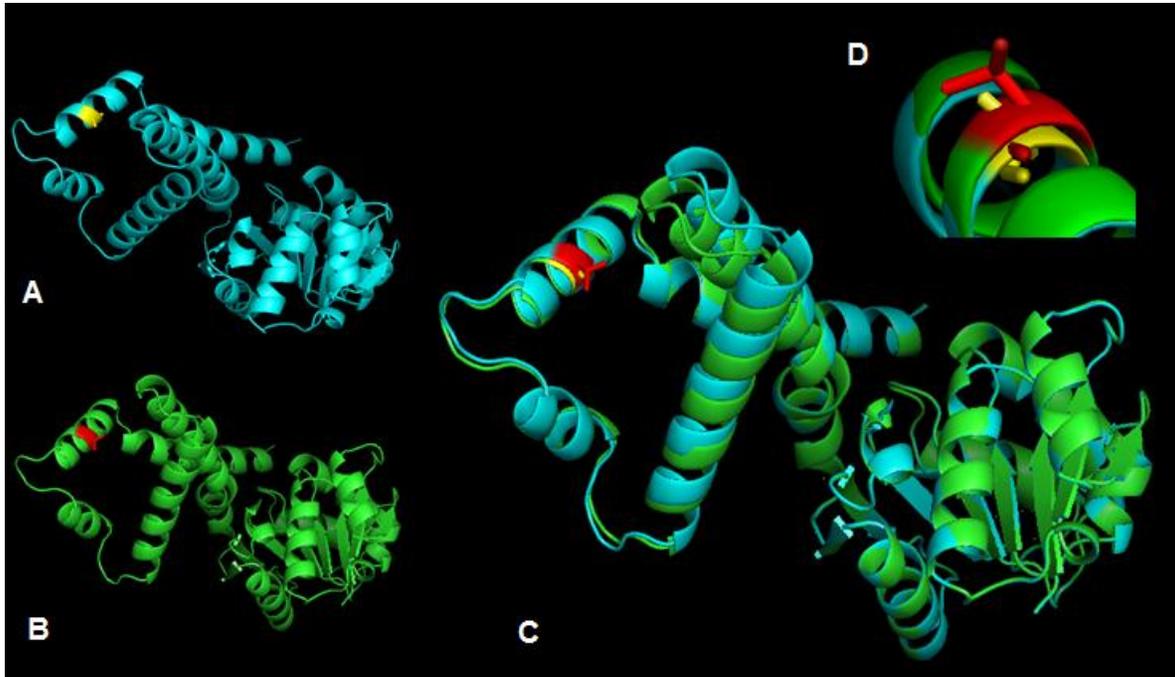


Figura 36: Estrutura tridimensional da proteína PYCR1. (A) normal (em amarelo o aminoácido A241). (B) mutante (em vermelho o aminoácido V241). (C) A sobreposição do modelo estrutural normal ao modelo contendo o aminoácido mutante, demonstrando a conformação estrutural discrepante entre os resíduos. (D) Em destaque, a sobreposição dos aminoácidos alanina e valina na α -hélice 10.

Foi encontrada, ainda, uma troca de base no códon 301 A>G (p.S301S) no éxon 7 nos três indivíduos, em homozigose (SNP, rs61747618) (figura 37). Tal substituição conserva o aminoácido serina, tratando-se de uma mutação silenciosa. Essa alteração está relatada em banco de dados de polimorfismos.

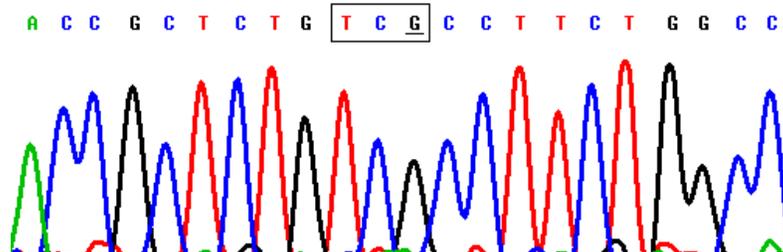


Figura 37: Eletroferograma demonstrando a alteração p.S301S em homozigose no gene *PYCR1*. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 301.

Em resumo, os resultados obtidos dos genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1* e *PYCR1* dos três indivíduos estudados são demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 – Resumo das alterações encontradas nos genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP1* e *PYCR1*, incluindo SNPs.

Gene	SNPs	Éxon/ Íntron	Alteração	Bases	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3
<i>ATP6V0A2</i>	rs1139320	1	IVS1-15	C→T	TT	TC	TC
<i>ATP6V0A2</i>	rs7301641	3	IVS3+103	C→T	TC	TT	TC
<i>ATP6V0A2</i>	rs9788204	3	IVS3+214	C→T	CT	CC	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs9787987	3	IVS3+217	T→C	CC	TT	CC
<i>ATP6V0A2</i>	rs1139789	4	p.N142N	C→T	CT	TT	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs11837144	4	IVS4+14	C→T	CT	CC	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs882563	5	IVS5-195	C→T	CT	CC	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs1399961	5	p.S157S	T→C	CT	TT	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs2271660	8	IVS8-23	T→C	CT	TT	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs7135542	13	p.N505N	T→C	CT	CC	CT
<i>ATP6V0A2</i>	rs17883456	19	p.A813V	C→T	CT	CC	CC
<i>SCYL1BP1</i>	rs7531125	1	p.G32G	A→C	CC	CC	CC
<i>SCYL1BP1</i>	rs7538037	3	IVS3-28	C→T	TT	CT	TT
<i>SCYL1BP1</i>	rs913257	5	p.E320K	G→A	AA	AA	GA
<i>PYCR1</i>	-	1	p.Q10X	C→T	TT	TT	CC
<i>PYCR1</i>	-	6	p.A241V	C→T	CC	CC	TT
<i>PYCR1</i>	rs61747618	7	p.S301S	A→G	GG	GG	GG

Legenda: SNPs, polimorfismos de nucleotídeo único; -, alteração não descrita; IVS, do inglês *intervening sequence*; p., posição do aminoácido na proteína; rs, do inglês *reference SNP*; N, asparagina; S, serina; A, alanina; V, valina; G, glicina; E, ácido glutâmico; K, lisina; Q, glutamina; X, códon finalizador.

4. Análise do perfil de expressão dos indivíduos com CLAR tipo II

A primeira etapa para análise dos dados de microarranjo para expressão diferencial é a realização do pré-processamento, utilizando-se o algoritmo RMA (*Robust Multichip Averaging*), introduzido por Irizarry et al. (76), disponível em ambiente R.

Os objetivos da etapa de pré-processamento de dados são as correções do *background*, seguida da normalização dos valores de expressão dentro de cada microarranjo e entre os microarranjos (para ajustar os valores de expressão pelos microarranjos), removendo assim variantes da técnica e erros sistemáticos, sem alterar a variação biológica dentro dos dados, assegurando assim que os resultados apresentem altos níveis de acurácia. Para tanto são utilizados arquivos *.CEL, ou seja, arquivos brutos gerados pela leitura do *GeneChip Scanner 3000*.

A figura nº 38 permite observar os gráficos de histograma (A e B) e *box-plot* (C e D) antes e pós normalização e correção de *background*, das amostra de pele fresca dos indivíduos com CLAR tipo II e controles, demonstrando o ajuste das intensidades dos sinais. As mesmas correções foram realizadas para as amostras de fibroblastos.

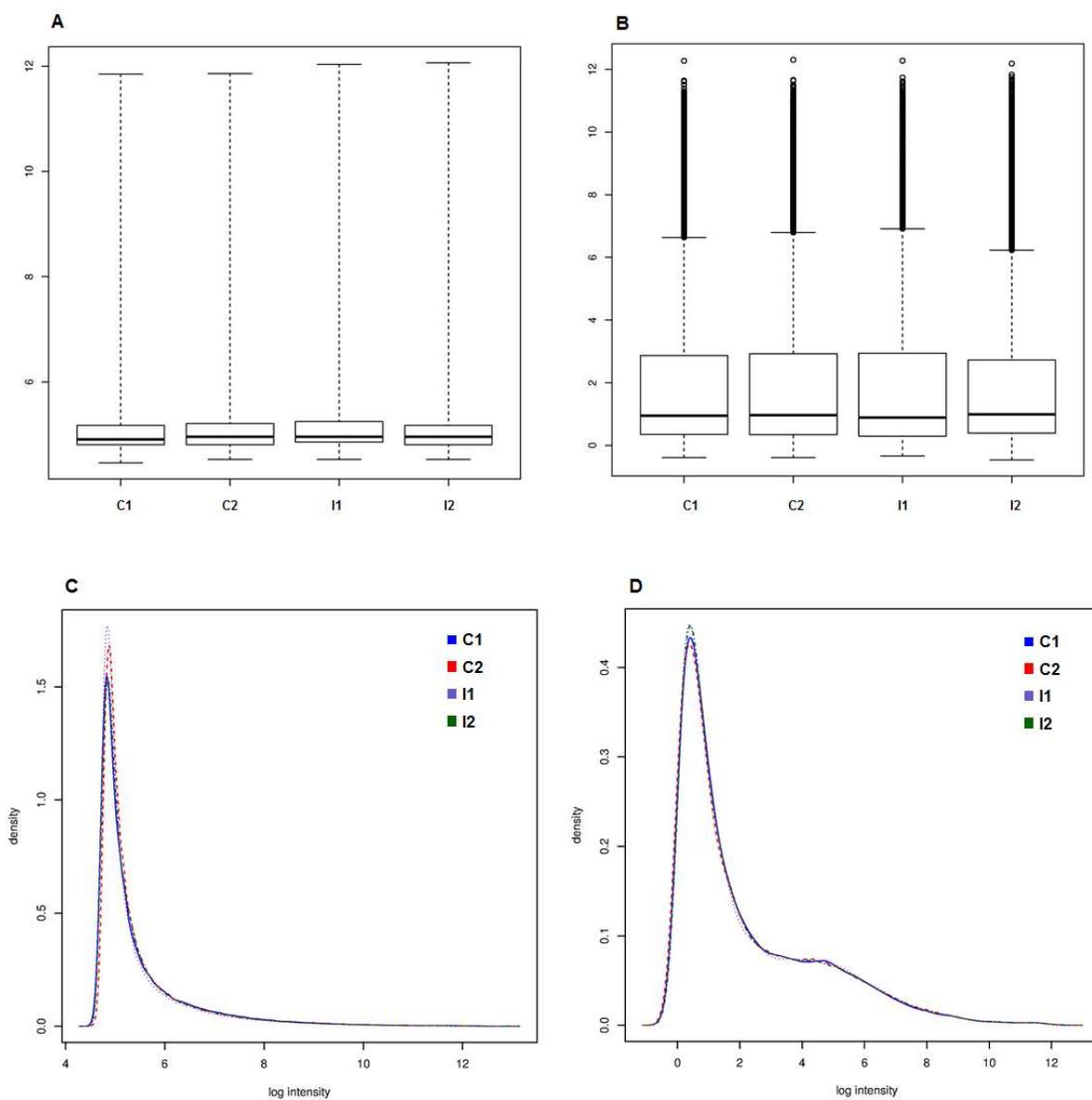


Figura 38: *Box-plot* e histograma dos *chips* de CLAR tipo II. (A e C) dados brutos; (B e D) após normalização; C, controle; I, indivíduo.

A partir dos dados normalizados foi realizada a clusterização das amostras, por meio da análise de componentes principais, PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), método que tem por finalidade básica, a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha de formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Com o uso do PCA pode-se observar o agrupamento das amostras de

microarranjo, ou detectar algum problema nestes agrupamentos, pois é esperado que amostras de um mesmo grupo apareçam próximas umas das outras no gráfico (77). A figura nº 39 ilustra o gráfico de PCA com os dados normalizados demonstrando o agrupamento das amostras de pele fresca e fibroblastos.

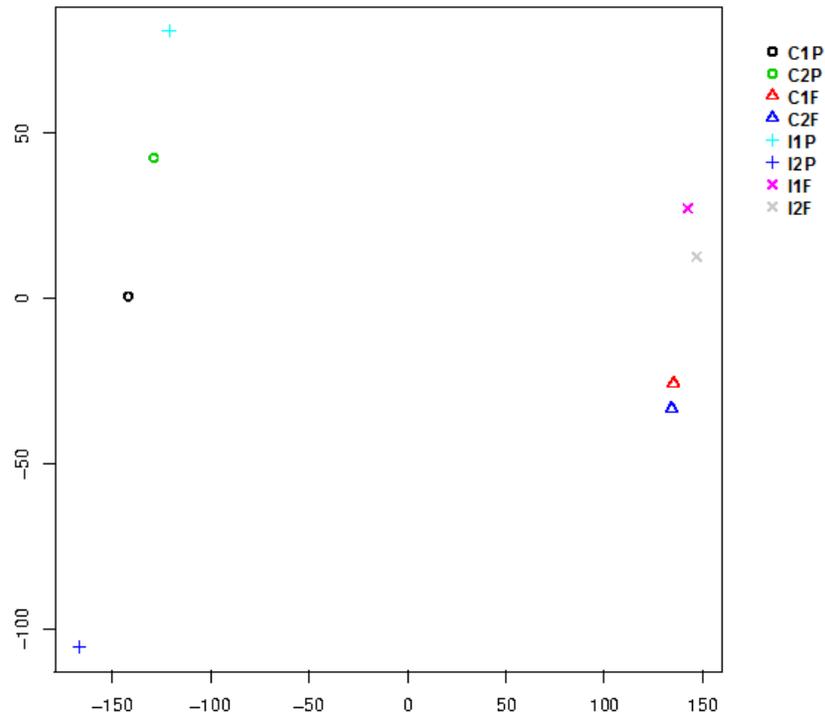


Figura 39: PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre indivíduos e controles em pele fresca e fibroblastos. Quanto mais próximos entre si, menor a variância da expressão gênica. C, controle; P, pele fresca; I, indivíduo; F, fibroblasto .

Também foi construído o *cluster* hierárquico que ilustra a diferença de expressão gênica entre os controles saudáveis e indivíduos, ajudando na visualização dos dados ao agrupar os genes que possuem um padrão de expressão semelhante (figura 40).

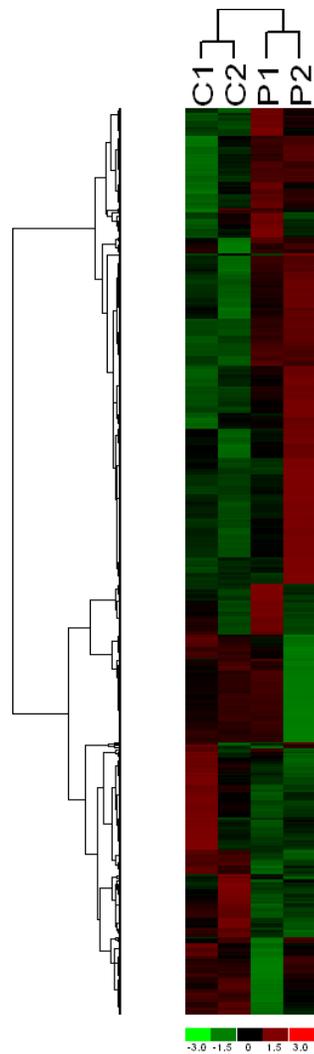


Figura 40: *Cluster* hierárquico dos genes diferencialmente expressos em pele fresca de CLAR tipo II comparados com controles. Linhas representam os genes; colunas representam as amostras. A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho representa uma maior expressão. C, controle; P, paciente.

Os valores de expressão de cada gene gerado após normalização foram então analisados. Dado o tamanho amostral (n de dois por grupo, indivíduo e controle) foi utilizado o teste não-paramétrico *Rank Product* (*RankProd*) que possui um algoritmo para identificar genes diferencialmente expressos ao basear-se no raciocínio biológico e usar o *fold change* das replicatas para o ranqueamento dos genes. Esta abordagem tem se mostrado consistente e

confiável, mesmo em casos com altos ruídos de fundo é uma ferramenta poderosa para identificar mudanças de expressão (68). A tabela 11 demonstra a comparação entre os genes diferentemente expressos nos controles e indivíduos com relação à pele fresca e fibroblastos.

Tabela 11 - Número de genes identificados como expressão diferencial pelo método *RankProd*.

Grupo	Genes	Expressão Aumentada	Expressão Baixa
Controle x Pele	542	230	312
Controle x Fibroblastos	1715	744	971

As correlações entre os conjuntos de dados (pele fresca x fibroblastos) mostrando os 90 genes em comum são apresentadas por meio do diagrama de Venn (figura 41). Além disso, a lista destes genes está apresentado no anexo 5.

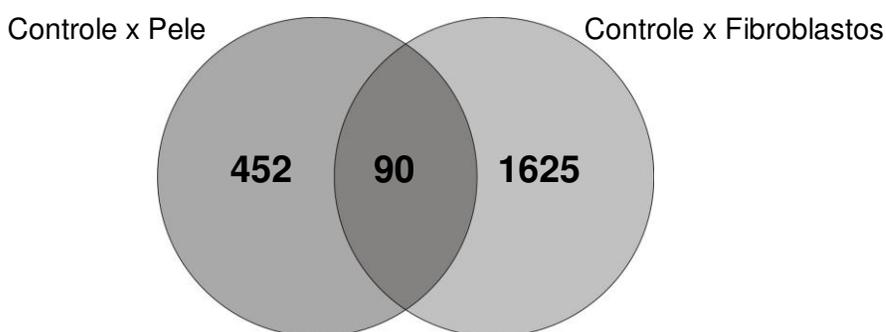


Figura 41: Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de genes diferentemente expressos que são comuns entre pele fresca e fibroblastos na CLAR tipo II.

O programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) versão 9.0 foi utilizado para identificar em quais vias canônicas e vias de sinalização estavam os genes diferencialmente expressos. As principais doenças, funções celulares e/ou moléculas relacionadas aos genes com aumento e diminuição de expressão estão representados na figura 42. Observamos que as vias mais significativas foram

relacionados a doenças e condições dermatológicas, além de “câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular”, bem como o metabolismo de lipídeos e desenvolvimento e morfologia celular, além das demais representadas abaixo.

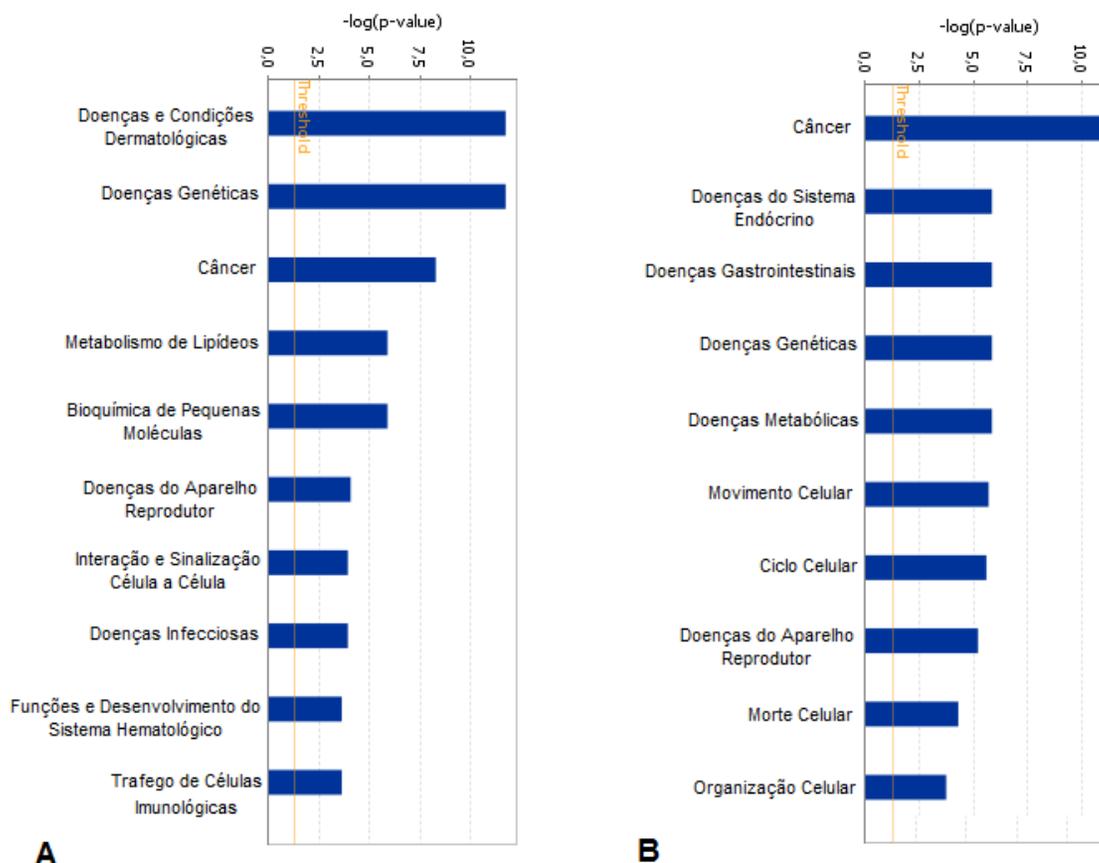
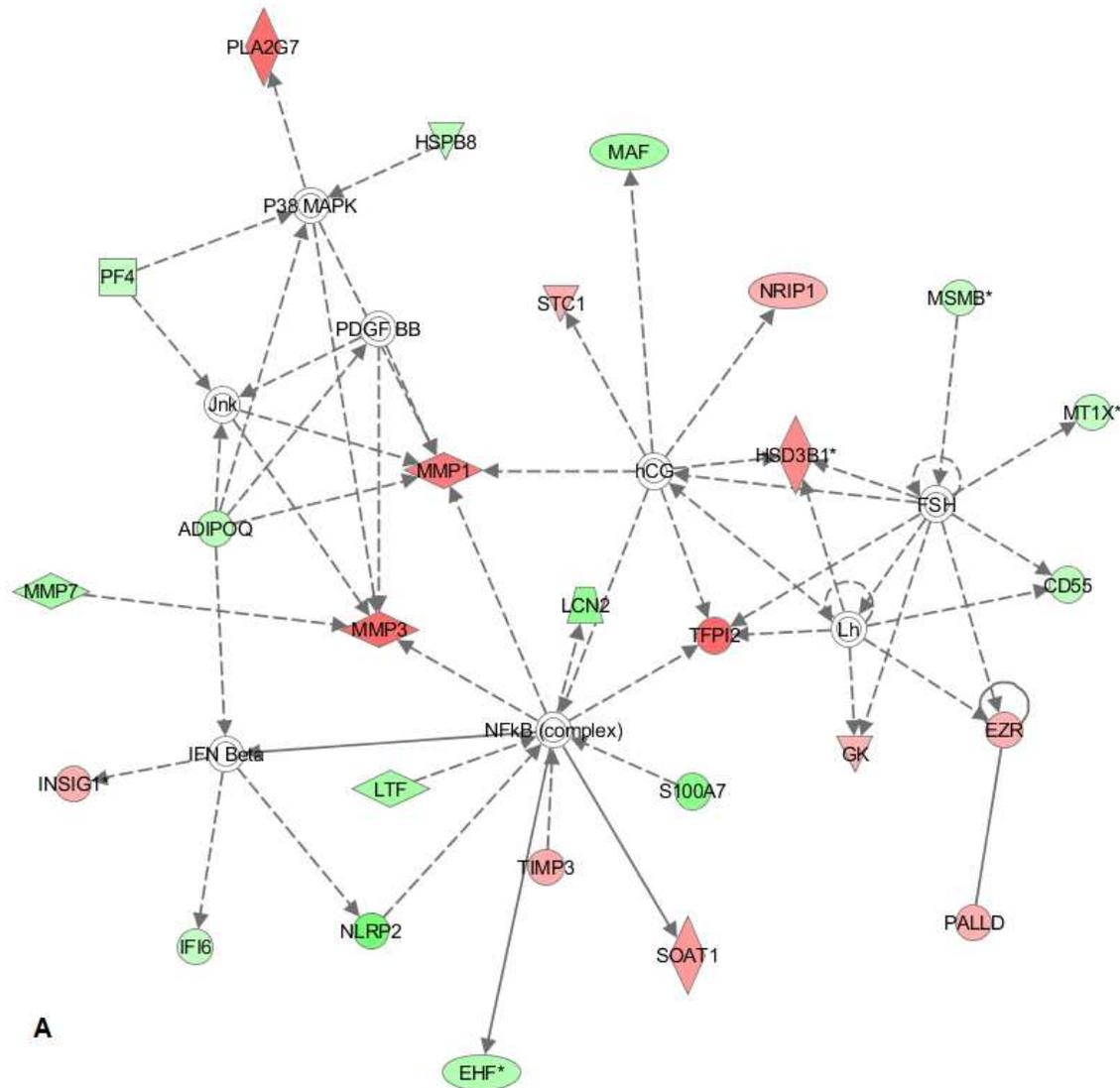
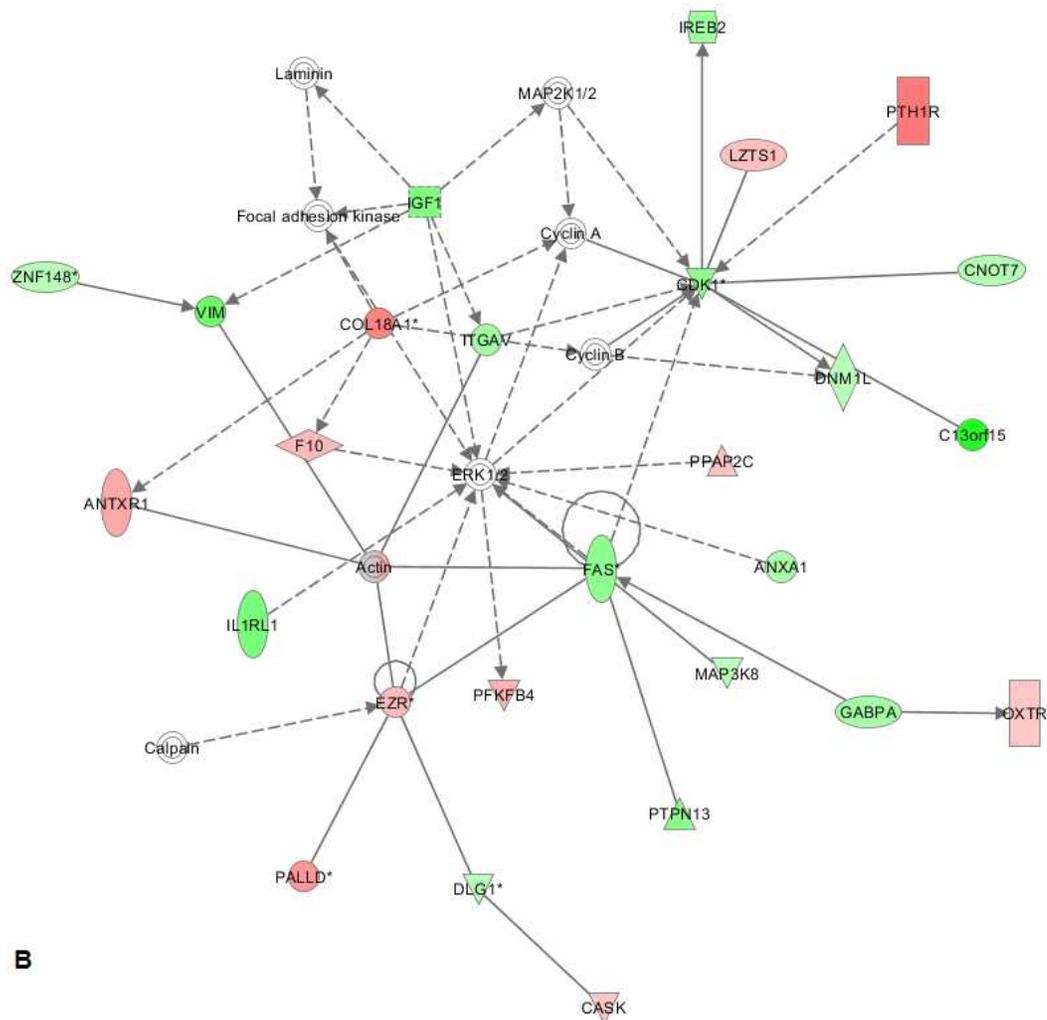


Figura 42: Vias de sinalização moduladas pela assinatura de expressão gênica em CLAR tipo II (A) pele fresca e (B) fibroblastos. O limiar estatístico (linha laranja) representa o ponto de corte para significância na escala log (eixo y, lado esquerdo). As análises foram realizadas no *software Ingenuity Pathways Analysis*.

Além disso, como exemplificado na figura 43, diversos genes e vias de sinalização foram diferencialmente modulados entre os casos de CLAR tipo II e controles saudáveis, muitos dos quais eram esperados baseado na lista de genes diferencialmente expressos gerada na análise dos microarranjos. A principal rede gênica alterada nas amostras de pele fresca está relacionada a “câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular” e é

formada por 27 genes diferencialmente expressos (figura 43A). Já na análise realizada a partir das amostras de fibroblastos mostraram que a principal via modificada está relacionada ao desenvolvimento e morfologia celular e inclui 35 genes diferencialmente expressos (figura 43B).





Legenda:

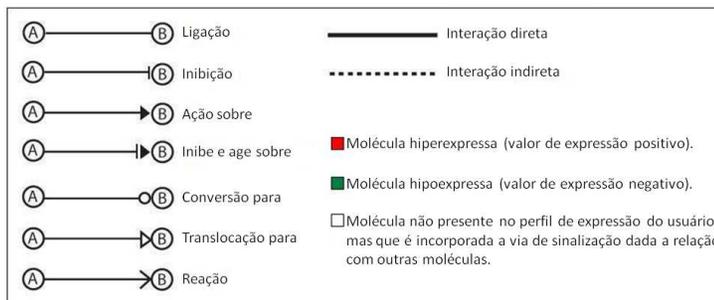


Figura 43: Representação esquemática das redes gênicas baseadas nos genes diferencialmente expressos, análise realizada no *software Ingenuity Pathways Analysis*. (A) “Via câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular” proveniente da análise das amostras de pele fresca. (B) Via de desenvolvimento e morfologia celular proveniente da análise das amostras de fibroblastos.

A análise de enriquecimento das categorias de ontologia gênica foi realizada por meio do programa DAVID para amostras de pele fresca e é demonstrada na figura 44. As principais categorias enriquecidas incluíram genes ligados à diferenciação e desenvolvimento epidérmico, ectodérmico e de queratinócitos (tabela 12).

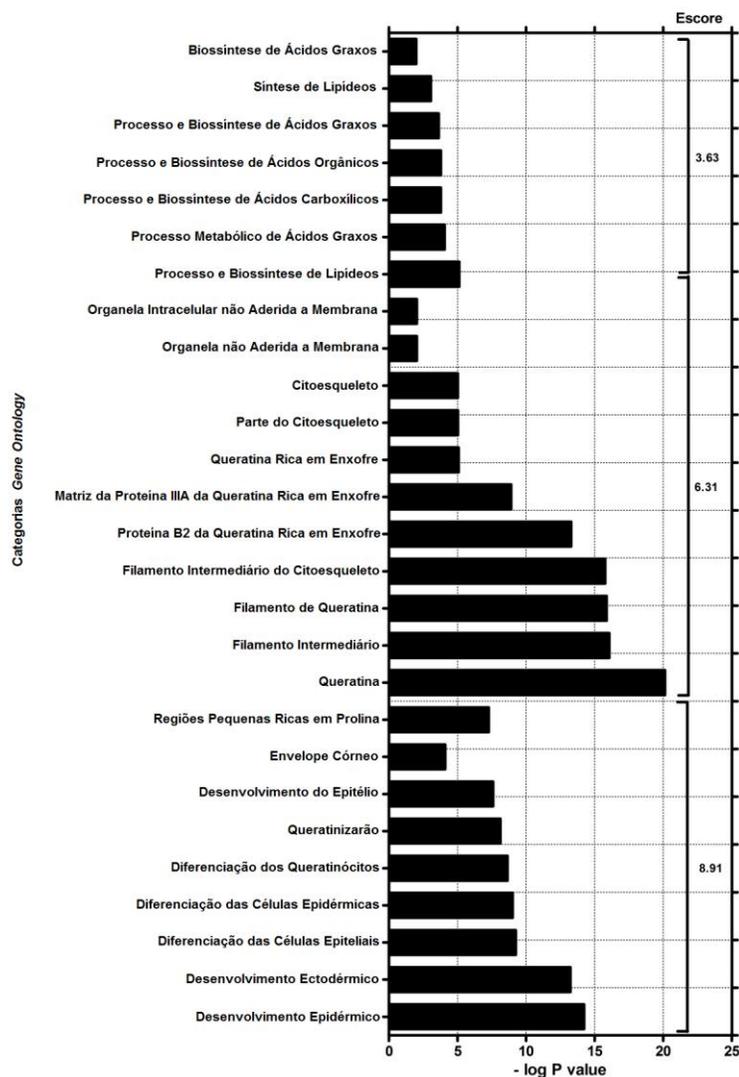


Figura 44: O painel descreve o enriquecimento para cada categoria de ontologia gênica (GO) baseado no *score* de enriquecimento (Escore) para amostras de pele fresca. Os clusters são formados por categorias de ontologia gênicas relacionadas. O valor de p demonstrado foi transformado em escala $-\log$ e indica a significância estatística, quanto menor o valor de p mais significativo é o enriquecimento. Análise realizada no *software* DAVID.

Tabela 12 - Apresentação dos genes presentes no enriquecimento das categorias de ontologia gênica por meio do *software* DAVID para o maior *Escore* em amostras de pele fresca.

DAVID	Genes
Desenvolvimento epidérmico	<i>FOXQ1, KRT85, LCE1B, CNFN, LCE1E, S100A7, ALDH3A2, KRT25, LCE2B, SCEL, SPRR2B, ALOX12B</i>
Desenvolvimento ectodérmico	<i>FOXQ1, KRT85, LCE1B, CNFN, LCE1E, S100A7, ALDH3A2, KRT25, LCE2B, SCEL, SPRR2B, ALOX12B</i>
Diferenciação de células epiteliais	<i>LCE1B, CNFN, RHCG, LCE1E, S100A7, EHF, LCE2B, SPRR2B, SCEL, TFPC2L1, EZR, GSTM3, TFPC2L1, TGM3, SPRR4, EHF, DLX5, LOR, SPRR3, SPRR1A, CDSN, AHNAK2, SPRR2G, CDSN, LCE3D</i>
Diferenciação de células epidérmicas	<i>KLF4, LCE1B, CNFN, LCE1E, S100A7, LCE2B, TGM3, SPRR4, SPRR2B, SCEL, LOR, SPRR3, SPRR1A, CDSN, AHNAK2, SPRR2G, CDSN, LCE3D, SCEL</i>
Diferenciação de queratinócitos	<i>LCE1B, CNFN, LCE1E, S100A7, LCE1E, LCE2B, TGM3, SPRR4, SPRR2B, SCEL, LOR, SPRR3</i>
Queratinização	<i>LCE1B, CNFN, LCE1E, LCE2B, SPRR2B, SPRR4, TGM3, LOR, SPRR3, SPRR1A, AHNAK2, SPRR2G, LCE3D</i>
Desenvolvimento do epitélio	<i>WNT4, LCE1B, CNFN, RHCG, LCE1E, S100A7, EHF, LCE2B, SCEL, SPRR2B, GREM1, TFPC2L1, OVOL2, EZR, GSTM3, TFPC2L1, TGM3, SPRR4, EHF, DLX5, LOR, SPRR3, SPRR1A, AHNAK2, CDSN, SPRR2G, LCE3D</i>
Regiões pequenas ricas em prolina	<i>LCE2B, LCE1E, SPRR4, SPRR2B, SPRR3, LCE1B, SPRR1A, C1orf68, LCE1E, SPRR2G</i>
Estrato Córneo	<i>SCEL, SPRR2B, SCEL, LOR, SPRR1A, CNFN, CDSN, CDSN, SPRR2G</i>

5. PCR em tempo real

A validação do sistema foi realizada utilizando sete concentrações diferentes de cDNA, iniciando as diluições com 200 ng (diluições seriadas de cinco vezes). Com os dados da cinética de amplificação das amostras e utilizando o programa *7500 System SDS Software*, construiu-se uma curva padrão para cada gene.

Os valores das inclinações (*slope*) das curvas e as eficiências, assim como a confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R2 são apresentados na tabela 13. Não foi possível obter os parâmetros para os genes alvo *S100A9* e *SPRR2B*, pois as amplificações somente puderam ser visualizadas na concentração de 200 ng depois do trigésimo quarto Ct, o que não é recomendado pelo fabricante.

Tabela 13 - Resultado da validação dos diferentes iniciadores e sondas (ensaios) utilizados. Valores de *slope*, utilizados para cálculo da eficiência, e de R2.

Ensaio	Inclinação (slope)	Eficiência	R2
<i>EZR</i>	-3,561	0,91	0,996
<i>PALLD</i>	-3,435	0,95	0,942
<i>GAPDH</i>	-3,444	0,95	0,997
<i>SDHA</i>	-3,521	0,92	0,994

Para determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, construiu-se um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos Cts do controle endógeno e do gene de interesse obtidas para cada concentração (eixo Y). Na figura 45, são exemplificadas a curva de eficiência para o sistema *EZR/GAPDH* e a equação da reta correspondente à linha de tendência, mostrando que o Δ Ct das amostras não está variando significativamente entre as diferentes diluições.

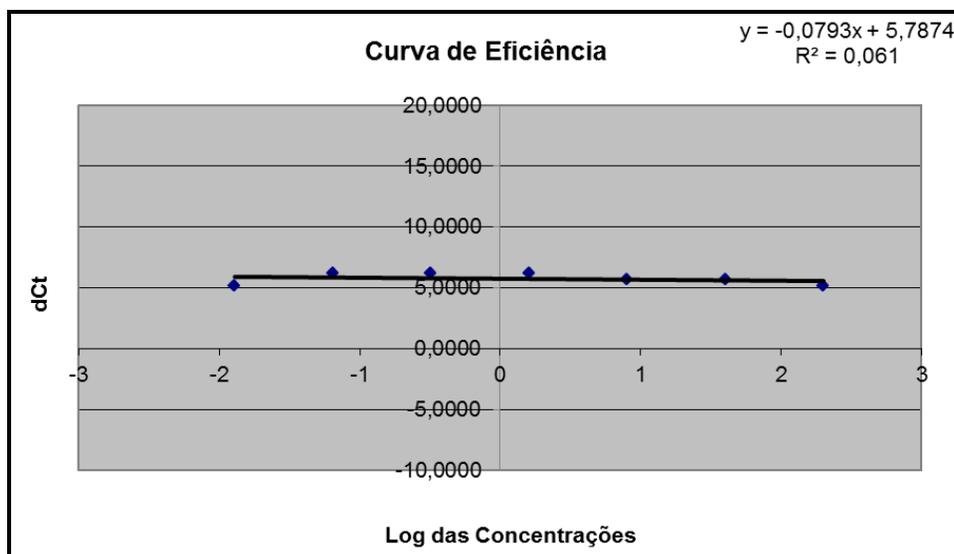


Figura 45: Curva de Padronização do PCR em Tempo Real. Podemos analisar a linha de tendência obtida após construção do gráfico, a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Dessa forma, prosseguiu-se com os experimentos utilizando 40 ng de cDNA para todas as reações de PCR em tempo real. Os experimentos de quantificação foram realizados em triplicatas e, após análise dos RQ para cada um dos genes de interesse em relação a ambos os controles endógenos, os resultados analisados são mostrados nas figuras 46 e 47.

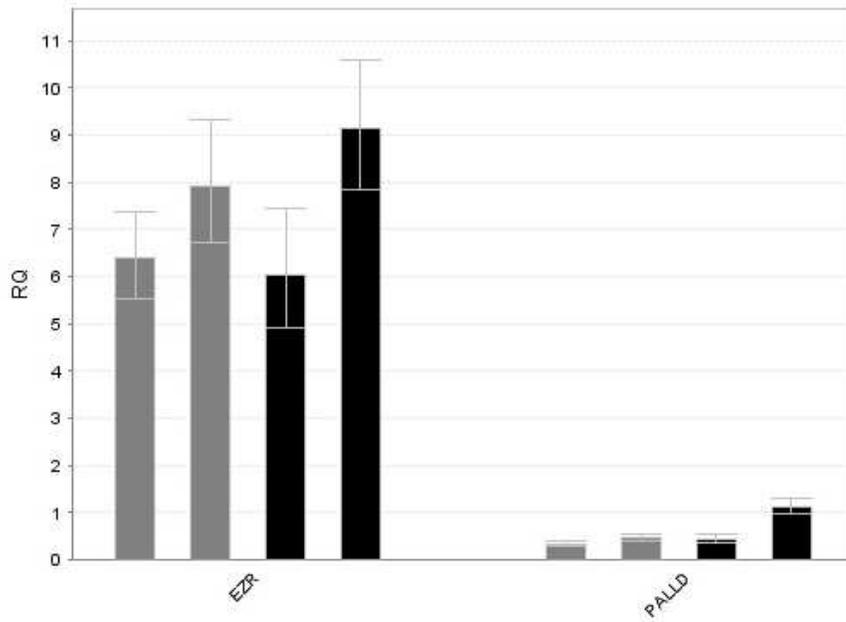


Figura 46: Quantificação relativa da expressão dos genes *EZR* e *PALLD*, por PCR em tempo real, em pele fresca de indivíduos com CLAR tipo II (cinza) e controles saudáveis (preto), utilizando *GAPDH* e *SDHA* como controle endógeno. Barras verticais indicam quantificação relativa mínima e máxima (RQmin e RQmax).

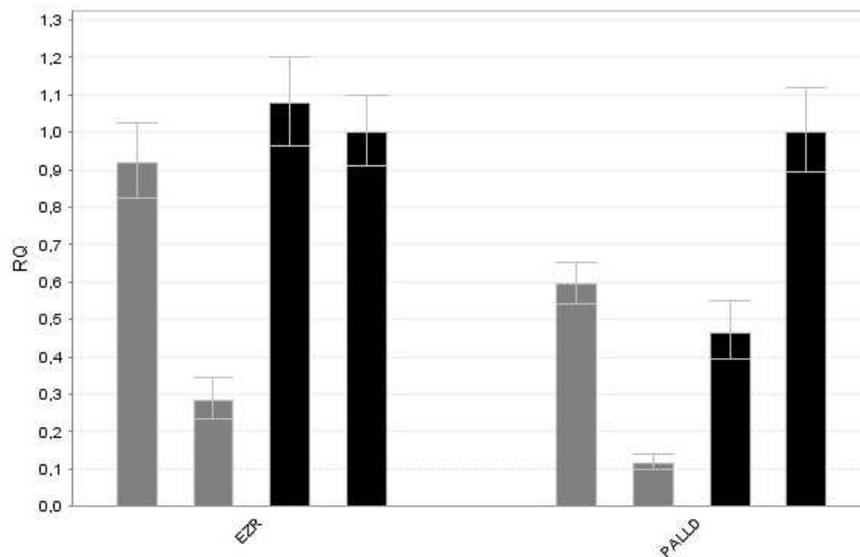


Figura 47: Quantificação relativa da expressão dos genes *EZR* e *PALLD*, por PCR em tempo real, em fibroblastos de indivíduos com CLAR tipo II (cinza) e controles saudáveis (preto), utilizando *GAPDH* e *SDHA* como controle endógeno. Barras verticais indicam quantificação relativa mínima e máxima (RQmin e RQmax).



DISCUSSÃO

Em 2008, nosso grupo de estudo publicou os resultados das análises dos genes *LOX*, *FBLN4* e *FBLN5*, não sendo identificadas mutações nos indivíduos com CLAR tipo II (17). No mesmo ano, Hennies et al. (47), bem como, Kornak et al. (44), descreveram uma correlação genótipo-fenótipo entre os genes *SCYL1BP1* e *ATP6V0A2* com quadros clínicos compatíveis a GO, CLAR tipo II e SPE sugerindo uma abordagem prática de diagnóstico.

As mutações no gene *ATP6V0A2* demonstrada em pacientes com CLAR tipo IIA e SPE pertencem ao grupo dos defeitos congênitos da glicosilação (CDG), mostrando um papel central da subunidade $\alpha 2$ da H⁺ATPase tipo IV. Estes achados sugerem que a CLAR tipo II e SPE são variantes fenotípicas da mesma alteração genética, mas não foi suficiente para explicar todos os casos, incluindo os indivíduos descritos no presente estudo, posto que apenas alterações comuns foram encontradas nos indivíduos analisados (39, 44, 45).

A gerodermia osteodisplástica foi associada a mutações que levam à perda da função no gene *SCYL1BP1* (47). Os mesmos achados foram apresentados por Al-Dosari e Alkuraya (48), sendo que tais autores sugeriram que o gene *SCYL1BP1* seria o único para a condição denominada de GO (embora atualmente se saiba que outro gene, o *PYCR1*, também esteja associado). A proteína localiza-se no aparelho de Golgi e interage com Rab6, sendo altamente expressa na pele e nos osteoblastos. Em nosso estudo, nos pacientes com sinais clínicos característicos de CLAR tipo II, nenhuma mutação patogênica foi identificada no gene *SCYL1BP1*.

O gene *PYCR1* foi recentemente identificado como responsável pela CLAR tipo II, SPE, GO e CLAR tipo III. Baseado nas características clínicas e histológicas, os indivíduos estudados no presente trabalho apresentaram manifestações típicas de CLAR tipo II, que incluem cutis laxa, características dismórficas, osteopenia, hérnias, flacidez articular, retardo mental, dentre outras, semelhantes aos relatos prévios.

A patogênese subjacente do *PYCR1* relacionada a CLAR tipo II parece estar relacionada com a função mitocondrial prejudicada da pirrolina-5-carboxilato reductase-1, proteína localizada na mitocondria. Embora a proteína PYCR1 catalise

o último passo na síntese de prolina, os indivíduos afetados relatados na literatura não apresentam hipoprolinemia. Alterações na morfologia da mitocôndria, no potencial da membrana e o aumento na taxa de apoptose após estresse oxidativo foram evidenciados nos fibroblastos dos indivíduos afetados (40), sugerindo que *PYCR1* possa estar envolvido na manutenção da morfologia mitocondrial, sendo importante na resposta celular ao estresse oxidativo. Evidências recentes têm indicado um papel crucial da morfologia mitocondrial na regulação da fisiologia celular, uma vez que a neurodegeneração de sinalização de cálcio, bem como a vida e a morte celular sofrem influências com mudanças na forma mitocondrial e sua dinâmica (52, 78, 79, 80).

Além disso, a deficiência da proteína mitocondrial pirolina-5-carboxilato sintase (*P5CS*, OMIM 138250), necessária para a biossíntese de prolina causa alterações neurocutâneas semelhante às encontradas em CLAR tipo II. A deficiência de *P5CS* leva à diminuição dos níveis de prolina e ornitina em alguns pacientes (46). Bicknell et al. (81) relataram uma mutação missense em *P5CS* em um indivíduo com pele enrugada e redundante sobre o abdôme, mãos, pés, peito e da face, além de luxações articulares, atraso grave no desenvolvimento global e coreoatetose. Curiosamente, anomalias da morfologia mitocondrial foram observadas em fibroblastos com alteração no *P5CS*. Esta evidência é relevante para concluir que *PYCR1* está relacionado com CLAR tipo II e que o comprometimento da morfologia mitocondrial pode estar envolvida com o (aspecto de) envelhecimento prematuro e com as manifestações neurológicas de cutis laxa (52).

O presente estudo revelou duas novas variantes do gene *PYCR1*, que pode ter implicações na doença CLAR tipo II. A primeira alteração é uma troca de base única (CAG > TAG) identificada no nucleotídeo 28 do éxon 1 do gene *PYCR1*, causando um códon de parada prematuro no aminoácido 10 (p.Q10X) e, conseqüentemente, uma proteína truncada. Os resultados encontrados por Lin et al. (52), também em pacientes com a CLAR tipo II, demonstrou a deleção do nucleotídeo citosina na posição 345 do éxon 4 (c.345delC), a alteração causa mudança na matriz de leitura, e posteriormente a interrupção prematura da

tradução proteica no códon 121, levando a formação de uma proteína truncada (p.P115fsX7) com perda de 199 aminoácidos. Resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Além desta mutação foi identificada uma outra variante em homozigose ainda não descrita na literatura, no éxon 6 (c.722C>T; p.A241V). Relatos anteriores identificaram predominantemente mutações *misense* e de sítio de *splicing* nos éxons 4, 5 e 6 (40, 49). Devido à dificuldade em medir o impacto no fenótipo de mutações *misenses*, foi realizada análises *in silico*, a fim de prever os efeitos potenciais dessa variante. Para a realização deste estudo foram utilizados os algoritmos MutPred, Panther, SNPs & GO, PolyPhen PolyPhen2 e escala Grantham e tal abordagem revelou que o aminoácido trocado é altamente conservado entre as espécies e que a alteração p.A241V no gene *PYCR1*, pode possui um efeito prejudicial (figura 34).

Também foi realizado o teste *in silico* para a análise estrutural da variante p.A241V realizada por homologia com o modelo de estrutura previamente publicada, sendo que o resíduo se encontra na α -hélice 10 da proteína PYCR1 (65), região está de grande importância na proteína, pois impede a formação do dímero, alterando assim o local de ligação com o co-fator e com o substrato. Embora a princípio a alteração não traga mudanças estruturais significantes, a troca do aminoácido alanina pela valina na posição 241, causada pela mutação, provavelmente interfere na rede de interações entre os aminoácidos. A análise dos contatos internos realizados pelo resíduo V241 na proteína *PYCR1* mutante p.A241V revelou a perda da ponte de hidrogênio de cadeia principal com os aminoácidos H243 e L245 e a interação hidrofóbica com L245. Além disso, na proteína mutante uma nova interação hidrofóbica foi estabelecida com o resíduo T238 (figura 35 e 36).

Essas alterações foram pesquisadas em uma amostra composta por 100 indivíduos controle e não aparentados com os sujeitos da pesquisa, sendo observada uma frequência de 100% de alelos selvagens. Portanto, as alterações identificadas não podem ser consideradas como polimorfismo. Além disso, combinando informações dos testes *in silico*, a presença do aminoácido valina na

posição 241 se mostrou anormal e associada à doença, o mesmo sendo válido para a perda de 310 aminoácidos causada pela mutação p.Q10X. Essas alterações não haviam sido documentadas previamente no gene *PYCR1*.

Pela nova sugestão de classificação, pode-se relacionar os indivíduos deste trabalho como CLAR tipo IIB (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação dos sinais clínicos apresentados entre os indivíduos com mutações nos gene *PYCR1* e os indivíduos do estudo (modificado de Mohamed et al. (46)).

	<i>PYCR1</i>	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3
Cutis laxa	++	++	++	++
Retardo psicomotor	+	++	+	++
Convulsões	+	-	-	-
Neuropatias	-	-	-	-
Hipotonia	-	+	+	-
Movimentos atetóides	++	-	-	-
Disgenesia cerebral	-	?	?	?
Hipoplásica do corpo caloso	++/-	?	?	?
Fontanela ampla/Fechamento tardio	-	+	+	+
Microcefalia	+/-	-	-	-
Dismorfismos faciais	+	+	+	+
Retardo no crescimento	+	+	+	+
Hiperfrouxidão articular	+	+	+	+
Polegares aduzidos/artrogripose distal	++	-	++	+
Hérnias	++	+	+	+
Catarata	+/-	-	-	-

Legenda: Ind., indivíduo; +, presente (+ = leve, ++ = moderada); -, ausente; ?, desconhecido.

Os trabalhos recentemente publicados de Yildirim et al. (51) e de Kouwenberg et al. (53) destacam a relação entre os indivíduos com CLAR tipo IIB

e alterações no gene *PYCR1* comparados clinicamente com mutações no gene *SCYL1BP1* para GO. Estes trabalhos concluem que várias características clínicas nestas condições se sobrepõem, incluindo cutis laxa em dorso das mãos e pés, características dismórficas, diminuição da densidade óssea, e hiperfrouxidão articular. Por outro lado, existem sintomas que distinguem CLAR tipo II de GO, como microcefalia e fontanela ampla e de fechamento tardio, os quais são raros em GO, mas são achados frequentemente relatados em pacientes com CLAR tipo II e alterações no gene *PYCR1* (CLAR tipo IIB) e mutações no gene *ATP6V0A2* (CLAR tipo IIA). Polegares aduzidos, contraturas e a posição anormal do pulso, no entanto, são características de CLAR tipo IIB, além de retardo do crescimento intra-uterino ser comum em pacientes com CLAR tipo IIB devido a mutações *PYCR1*, mas não em pacientes com GO. Deficiência mental e atraso na fala estão presentes na maioria dos pacientes com mutações em *PYCR1*, mas são raros em pacientes com GO. Finalmente, osteopenia e fraturas espontâneas são características em pacientes com GO, mas não em pacientes com mutações em *PYCR1*.

Com base nestas informações, os autores sugerem que, embora haja uma sobreposição fenotípica de CLAR tipo IIB e GO, a presença de microcefalia, retardo psicomotor e da falta de fraturas ósseas espontâneas, os pacientes com CLAR tipo IIB devido a mutações *PYCR1* podem ser distinguidos clinicamente de pacientes com mutações *SCYL1BP1* e GO (51, 53).

As características acima apresentada para CLAR tipo IIB e alterações no *PYCR1* estão presentes nos pacientes desta casuística, embora fraturas recorrentes tenham sido descritos no indivíduo 1 e osteopenia no indivíduo 2 em nossa casuística. Esse fato vai ao encontro dos trabalhos de Reversade et al. (40) e de Mohamed et al. (46), que também descrevem osteopenia entre os achados clínicos de indivíduos que apresentam mutação no gene *PYCR1*.

Com base nestas informações e pelo fato destas condições apresentarem uma grande variabilidade genética, a pesquisa prosseguiu com os estudos de expressão global, com a finalidade de obter mais informações sobre as possíveis vias adjacentes apresentadas nestes grupos de doenças.

Estudos de expressão gênica em larga escala nunca haviam sido realizados para caracterizar perfis de expressão em indivíduos com cutis laxa, incluindo CLAR tipo IIB. Devido à raridade dessa condição e pelo fato da coleta de pele se tratar de um procedimento invasivo, utilizamos nesta etapa dois dos indivíduos constituintes da casuística, visto que uma das famílias negou-se a participar da coleta de pele, necessária para extração de RNA. É importante ressaltar que, embora o número de sujeitos seja pequeno, esta análise é válida para se obter algumas evidências sobre outros genes ou vias gênicas que possam estar relacionadas com a doença. Neste sentido este trabalho é pioneiro e pode efetivamente contribuir com novos conhecimentos sobre a CLAR tipo IIB.

Além de usarmos pele fresca (condição ideal) para esta análise, também empregamos a técnica de *chip* em cultura de fibroblastos de indivíduos com CLAR tipo IIB e controles a fim de aferir se há alteração de expressão neste tipo de técnica. Portanto, comparou-se o perfil de expressão gênica de duas amostras de pele fresca e fibroblastos de indivíduos com CLAR tipo IIB com controles saudáveis, utilizando a plataforma *Human Genome U133 Plus 2.0 Array* da *Affymetrix*.

Para as análises dos genes diferentemente expressos no nosso trabalho não foram utilizados cortes em *fold change* e *pfp* (falso positivo), pois estes limitariam muito a quantidade dos genes apresentados. Caso o critério de *pfp* < 0.01 fosse adotado para amostras de pele fresca apenas um transcrito (CDNA FLJ11831 fis, clone HEMBA1006562 - *Affymetrix* ID, 234082_at) com desconhecida função celular seria válido com o valor de *fold change* de -5,23.

A cultura de fibroblastos foi inicialmente padronizada nas amostras residuais de procedimento cirúrgico (dermolipectomia e postectomia) de indivíduos saudáveis, com apenas uma passagem, para que a interferências do efeito da cultura no padrão de expressão gênica fosse a menor possível. Ao iniciar a cultura de fibroblastos para os indivíduos investigados foi necessário de aumentar o número de passagens, com obtenção de culturas homogêneas a partir da terceira passagem. Também houve a necessidade de adicionar fator de crescimento de fibroblasto devido a presença de poucas células aderidas no frasco da cultura e à

não possibilidade de nova coleta do material. O procedimento para os controles utilizados nos *chips* de array, para a investigação de fibroblastos, foram iguais aos realizados para os indivíduos da pesquisa, para diminuir a possibilidade de um viés entre as amostras. Os resultados obtidos na análise de componentes principais (PCA), mostra que essa estratégia interferiu com o padrão de expressão gênica dos fibroblastos em relação às amostras de pele fresca visto que ambos os grupos apresentaram agrupamentos diferentes. Na figura 39 fica demonstrado claramente que a cultura de fibroblastos homogeneizou a expressão das amostras controle e de pacientes, além de tornar discrepantes os resultados dos *fold changes* de 52 genes dos 90 genes diferentemente expressões apresentados no anexo 5. É importante salientar que ainda na análise do PCA pode-se notar que os pacientes 1 e 2 de pele fresca possuem perfis diferenciados.

A partir destas informações analisamos cuidadosamente os genes que apresentam concordância entre os *fold change* de pele fresca e fibroblasto, e os genes *EZR* e *PALLD* (*fold change* 1,1 e 1,09, respectivamente), foram selecionados. Ambos os genes estão com aumento de expressão e fazem parte da via de câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular analisadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), além de estarem representados nas principais categorias de enriquecimento ontológico gênico visto por meio do programa *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID).

O gene *EZR* (OMIM 123900) codifica a chamada ezrina, também conhecida como citovilina, uma proteína de membrana citoplasmática periférica altamente expressa em células de epitélio intestinal e que serve de principal substrato citoplasmático para certas proteínas tirosina-quinases. Junto com outras proteínas da mesma família, age na ligação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina, estando envolvidas em uma série de funções celulares, tais como adesão celular, migração e organização das estruturas da superfície celular (82, 83).

O gene *PALLD* (OMIM 608092), também conhecido como *KIAA0992*, codifica a paladina, que é um componente dos microfilamentos que contém actina

e que controlam o formato, a adesão e a contração celular. Esta proteína está co-localizada com a ezrina em células de musculatura lisa intestinal (84).

Deste modo, ambas as proteínas poderiam eventualmente se relacionar com o desenvolvimento de divertículos intestinais, sinal descrito em indivíduos com CLAR tipo II.

A validação pela técnica de PCR em tempo real para os genes *EZR* e *PALLD*, não foi capaz de confirmar a expressão diferencial vista no microarranjo de DNA. As explicações para este fato podem estar relacionadas pelo baixo número de indivíduos empregados na análise e conseqüentemente à falta de uma análise estatística mais robusta que pudesse evidenciar de maneira mais fidedigna os falsos positivos.

Também foram selecionados para confirmação por meio da técnica de PCR em tempo real dos resultados do perfil de expressão global os genes *SPRR2B* e *S100A9* a partir dos resultados obtidos pela análise de pele fresca. O gene *SPRR2B* apresentou-se com baixa expressão com valor de *fold change* de -1,65, este faz parte de todas as categoria de enriquecimento ontológico gênico apresentadas na tabela 12, além de fazer parte da via de sinalização intercelular, e interação, doenças inflamatórias e resposta imunológica, funções essas identificadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis*.

SPRR2B (OMIM 182268) é o nome do gene que codifica a proteína 2B pequena rica em prolina, sendo um dos sete genes da subfamília SPRR2 desse tipo de proteínas (85). Sua função é pouco conhecida, o que despertou o interesse diante da possibilidade de associá-lo à CLAR tipo IIB, eventualmente relacionado ao metabolismo da prolina.

O gene *S100A9* apresentou-se com baixa expressão com valor de *fold change* de -2,35. Este gene faz parte da via de sinalização e interação célula a célula, desenvolvimento e função do sistema hematológico, tráfego de células imunológicas, funções essas identificadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis*.

S100A9 (OMIM 123886) é o nome dado ao gene que codifica a proteína S100A9 de ligação ao cálcio. Junto com a proteína S100A8, é um componente

principal no metabolismo de cálcio e zinco no citosol de neutrófilos, monócitos e queratinócitos. O gene em questão está mais relacionado com resposta inflamatória a infecções bacterianas, mas também foi descrito em associação com a psoríase, doença cutânea na qual ocorre hiperproliferação de queratinócitos. Zenz et al. (86) ao induzir uma deleção dos genes *JunB* e *c-Jun* em camundongos adultos, conseguiram produzir um fenótipo histológico e molecular que lembrava as características da psoríase, incluindo lesões artríticas. Seus achados sugerem que alterações nesse sistema gênico podem ser suficientes para iniciar alterações cutâneas e artrite, correlacionando os sistemas osteoarticular e cutâneo, sendo ambos predominantemente alterados na CLAR tipo IIB.

Não foi possível validar os genes alvo *S100A9* e *SPRR2B*, pois os parâmetros para a validação do sistema de PCR em tempo real não foram alcançados, devido à concentração limitada de RNA.

Também não pode deixar de ser ressaltado que os genes diferencialmente expressos representam um dado momento, podendo eventualmente ter resultados distintos se aplicado em diferentes idades nos mesmos pacientes. Ainda, é importante salientar que apesar da limitação do tamanho amostral para a análise de expressão gênica diferencial, o emprego do microarranjo de DNA neste estudo foi pioneiro e colabora para uma visão global dos eventos celulares da CLAR IIB, além de identificar outros genes que podem estar contribuindo para os fenótipos encontrados na doença.



CONCLUSÕES

1. Trata-se do primeiro trabalho no Brasil a estudar os genes *ATP6V0A2*, *SCYL1BP* e *PYCR1* em pacientes com CLAR tipo II, e considerando os resultados obtidos pode-se concluir que as duas novas alterações genéticas (p.Q10X e p.A241V) encontradas no gene *PYCR1* classificam os indivíduos como CLAR tipo IIB, conforme a atual nosologia deste grupo de distúrbios.

2. O material utilizado para a cultura de fibroblastos nestes pacientes revelou-se inadequado para a análise da expressão gênica. Além disso, a cultura de fibroblastos dos pacientes modificou a expressão gênica se comparado com a expressão da pele fresca, além de aproximar-se dos resultados da expressão obtida com os indivíduos controles, também de cultura.

3. Os estudos de microarranjo, principalmente por meio de pele fresca, forneceram uma visão completa das vias celulares diferencialmente expressas em tal condição, evidenciando genes relacionados a alterações dermatológicas, além do grupo denominado “câncer, desenvolvimento e função do tecido conjuntivo, esquelético e muscular”, quando comparados com controles.

4. Há evidências de que os genes *EZR* e *PALLD* estejam envolvidos nos mecanismos envolvidos nessa doença, possivelmente como genes modificadores, entretanto a análise da validação independente por PCR em Tempo Real para tais genes não foi adequada devido ao número limitado de amostras deste estudo e a variação observada entre as mesmas.

5. A validação para os genes *S100A9* e *SPRR2B* não foi possível pelo volume de massa molecular, o que foi fator limitante para a continuidade da padronização do sistema gene alvo-controle endógeno.

6. Este é o primeiro estudo que emprega a análise de microarranjos de DNA para explorar a expressão diferencial global de genes e identificação de vias celulares alteradas na CLAR tipo II. As bases moleculares adjacentes para a CLAR tipo II, SPE ou GO continuam indeterminadas. Novos estudos envolvendo microarranjos e/ou outra abordagem laboratorial são necessários para melhorar a classificação desse grupo de doenças.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. Steiner CE, Cintra ML, Marques-de-Faria AP. Cutis laxa with growth and development delay, wrinkly skin syndrome or geroderma osteodysplastica: report of two unrelated patients and literature review. *Genet Mol Biol.* 2005;28(2):181-90.
2. Fitzsimmons JS, Fitzsimmons EM, Guibert PR, Zaldua V, Dodd KL. Variable clinical presentation of cutis laxa. *Clin Genet.* 1985;28(4):284-95.
3. Der Kaloustian VM. Skin. In: Stwenson RE, Hall JG, Goodman RM. Human malformation and related anomalies. *Oxford Monographs on Medical Genetics.* New York: Oxford University Press; 1993.
4. Imaizumi K, Kurosawa K, Makita Y, Masuno M, Kuroki Y. Male with type II autosomal recessive cutis laxa. *Clin Genet.* 1994;45(1):40-3.
5. Reed W, Horowitz R, Beighton P. Acquired Cutis Laxa. *Arch Dermatol.* 1971;103(6):661-9.
6. Koch S, Williams M. Acquired Cutis Laxa: case report and review of disorders of elastolysis. *Pediatr Dermatol.* 1985;2(4):282-8.
7. Riveros CJ, Gavilan MF, Franca LF, Sotto MN, Takahashi MD. Acquired localized cutis laxa confined to the face: case report and review of the literature. *Int J Dermatol.* 2004;43(12):931-5.
8. Urban Z, Gao J, Pope FM, Davis EC. Autosomal dominant cutis laxa with severe lung disease: synthesis and matrix deposition of mutant tropoelastin. *J Invest Dermatol.* 2005;124:1193-9.
9. Gorlin RJ, Cohen Jr. MM, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck.* 4^a ed. New York: Oxford University Press; 2001.
10. Byers PH, Siegel RC, Holbrook KA, Narayanan AS, Bornstein P, Hall JG. X-linked cutis laxa: defective collagen cross-link formation due to decreased lysyl oxidase activity. *New Eng J Med.* 1980;303(2):61-5.

11. Tsukahara M, Imaizumi K, Kawai S, Kajii T. Occipital horn syndrome: report of a patient and review of the literature. *Clin Genet.* 1994;45(1):32-5.
12. Agha A, Sakati NO, Higginbotton MC, Jones JrKL, Bay C, Nyhan WL. Two forms of cutis laxa presenting in the newborn period. *Acta Paediatr Scand.* 1978;67(6):775-80.
13. Debré R, Marie J, Seringe P. "Cutis laxa" avec dystrophies osseuses. *Bull Med Soc Med Hop Paris.* 1937;53:1038-1039.
14. Allanson J, Austin W, Hecht F. Congenital cutis laxa with retardation of growth and motor development: a recessive disorder of connective tissue with male lethality. *Clin Genet.* 1986;29(2):133-6.
15. Patton MA, Tolmie J, Ruthnum P, Bamforth S, Baraitser M, Pembrey M. Congenital cutis laxa with retardation of growth and development. *J Med Genet.* 1987;24(9):556-61.
16. Sakati NO, Nyhan WL, Shear CS, Kattan H, Akhtar M, Bay C et al. Syndrome of cutis laxa, ligamentous laxity, and delayed development. *Pediatrics.* 1983;72:850-6.
17. Scherrer DZ, Alexandrino F, Cintra ML, Sartorato EL, Steiner CE. Type II autosomal recessive cutis laxa: report of another patient and molecular studies concerning three candidate genes. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(21):2740-5.
18. Pontz BF, Zepp F, Stob H. Biochemical, morphological and immunological findings in a patient with a cutis laxa-associated inborn disorder (De Barsy syndrome). *Eur J Pediatr.* 1986;145(5):428-34.
19. Karnes PS, Shamban AT, Olsen DR, Fazio MJ, Falk RE. De Barsy syndrome: report of a case, literature review, and elastin gene expression studies of the skin. *Am J Med Genet.* 1992;42:29-34.

20. Nanda A, Lionel J, Al-Tawari AA, Anim JT. What Syndrome is This? Autosomal Recessive Type II Cutis Laxa. *Pediatr Dermatol.* 2004; 21(2):167-70.
21. Bamatter F, Franceschetti A, Klein D, Sierro A. Gérdermie ostéodyplastique héréditaire. Un nouveau biotype de la "progeria". *Ann Pediat.* 1950;174:126-7.
22. Lisker R, Hernandez A, Martinez-Lavin M, Muchinick O, Armas C, Reyes P et al. Geroderma osteodysplastica hereditaria: Report of three affected brothers and literature review. *Am J Med Genet.* 1979;3(4):389-95.
23. Hunter AGW. Is geroderma osteodysplastica underdiagnosed? *J Med Genet.* 1988;25:854-57.
24. Eich GF, Steinmann B, Hodler J, Exner GU, Giedion A. Metaphyseal Peg in Geroderma Osteodysplasticum: a new genetic bone marker and a specific finding? *Am J Med Genet.* 1996;63(1):62-7.
25. Gazit E, Goodman RM, Katznelson BM, Rotem Y. The wrinkly skin syndrome: a new heritable disorder of connective tissue. *Clin Genet.* 1973;4(3):186-92.
26. Boente MC, Winik BC, Asial RA. Wrinkly skin syndrome: ultrastructural alterations of the elastic fibers. *Pediatric Dermatology.* 1999;16(2):113-7.
27. Zlotogora J. Wrinkly skin syndrome and the syndrome of cutis laxa with growth and development delay represent the same disorder. *Am J Med Genet.* 1999;85(2):194.
28. Al-Gazali LI, Sztriha L, Skaff F, Haas D. Geroderma Osteodysplastica and Wrinkly Skin Syndrome: are they the same? *Am J Med Genet.* 2001;101(3):213-20.
29. Gupta N, Phadke SR. Cutis laxa type II and wrinkly skin syndrome: distinct phenotypes. *Pediatric Dermatol.* 2006;23(3):225-30.

30. Boente MC, Asial RA, Winik BC. Geroderma osteodysplastica. Report of a new family. *Pediatric Dermatology*. 2006;23(5):467-72.
31. Ogur G, Yuksel-Apak M, Demiryont M. Syndrome of congenital cutis laxa with ligamentous laxity and delayed development: report of a brother and sister from Turkey. *Am J Med Genet*. 1990;37(1):6-9.
32. Goldblatt J, Wallis C, Viljoen D, Beighton P. Cutis laxa retarded development and joint hyper mobility syndrome. *Dysmorph Clin Genet*. 1988;1:142-4.
33. Casamassima AC, Wesson SK, Conlon CJ, Weiss FH. Wrinkly skin syndrome: Phenotype and additional manifestations. *Am J Med Genet*. 1987;27(4):885-93.
34. Azuri J, Mizrachi A, Weintraub S, Lerman-Sagie T. Neurological involvement in a child with the wrinkly skin syndrome. *Am J Med Genet*. 1999;82(1):31-3.
35. Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft GS, Kielty C, Wilmot C et al. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibers in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum Mol Genet*. 1998;7(6):1021-8.
36. Zhang MC, He L, Giro M, Yong SL, Tiller GE, Davidson JM. Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (*ELN*). *J Biol Chem*. 1999;274(2):981-6.
37. Markova D, Zou Y, Ringpfeil F, Sasaki T, Kostka G, Timpl R et al. Genetic heterogeneity in cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibuin-5 (*FBLN5*) gene. *Am J Hum Genet*. 2003;72(4):998-1004.
38. Das S, Levinson B, Vulpe C, Whitney S, Gitschier J, Packman S. Similar splicing mutations of the Menkes/mottled coppertransporting ATPase gene in occipital horn syndrome and the blotchy mouse. *Am J Hum Genet*. 1995;56(3):570-6.

39. Morava E, Guillard M, Lefeber DJ, Wevers RA. Autosomal recessive cutis laxa syndrome revisited. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(9):1099-110
40. Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, Fischer B, Chng SC, Li Y, et al. Mutations in *PYCR1* cause cutis laxa with progeroid features. *Nat Genet.* 2009;41(9):1016-21.
41. Khakoo A, Thomas R, Trompeter R, Duffy P, Price R, Pope FM. Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin Genet.* 1997;51(2):109-14.
42. Loeys B, van Maldergem L, Mortier G, Couke P, Gerniers S, Naeyaert J-M et al. Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (*FBLN5*) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet.* 2002;11(18):2113-8.
43. Huchtagowder V, Sausgruber N, Kim KH, Angle B, Marmorstein LY, Urban Z. Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006;78(6):1075-80.
44. Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A et al. Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit *ATP6V0A2*. *Nat Genet.* 2008;40(1):32-4.
45. Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, Fischer B, Dimopoulou A, et al. Loss-of-function mutations in *ATP6V0A2* impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum Mol Genet.* 2009;18(12):2149-65.
46. Mohamed M, Kouwenberg D, Gardeitchik T, Kornak U, Wevers RA, Morava E. Metabolic cutis laxa syndromes. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(4):907-16.
47. Hennies HC, Kornak U, Zhang H, Egerer J, Zhang X, Seifert W et al. Geroderma osteodysplastica is caused by mutations in *SCYL1BP1*, a Rab-6 interacting golgin. *Nat Genet.* 2008;40(12):1410-2.

48. Al-Dosari M, Alkuraya FS. A novel missense mutation in SCYL1BP1 produces geroderma osteodysplastica phenotype indistinguishable from that caused by nullimorphic mutations. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(10):2093-8.
49. Guernsey DL, Jiang H, Evans SC, Ferguson M, Matsuoka M, Nightingale M et al. Mutation in pyrroline-5-carboxylate reductase 1 gene in families with cutis laxa type 2. *Am J Hum Genet*. 2009;85(1):120-9
50. Kretz R, Bozorgmehr B, Kariminejad MH, Rohrbach M, Hausser I, Baumer A et al. Defect in proline synthesis: pyrroline-5-carboxylate reductase 1 deficiency leads to a complex clinical phenotype with collagen and elastin abnormalities. *J Inher Metab Dis*. 2011;34(3):731-9.
51. Yildirim Y, Tolun A, Tüysüz B. The phenotype caused by *PYCR1* mutations corresponds to geroderma osteodysplasticum rather than autosomal recessive cutis laxa type 2. *Am J Med Genet A*. 2010;155A(1):134-40.
52. Lin DS, Yeung CY, Liu HL, Ho CS, Shu CH, Chuang CK et al. A novel mutation in *PYCR1* causes an autosomal recessive cutis laxa with premature aging features in a family. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(6):1285-9.
53. Kouwenberg D, Gardeitchik T, Wevers RA, Häberle J, Morava E. Recognizable phenotype with common occurrence of microcephaly, psychomotor retardation, but no spontaneous bone fractures in autosomal recessive cutis laxa type IIB due to *PYCR1* mutations. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(9):2331-2.
54. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291: 1304–51.
55. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822): 860–921. International Human Genome Sequencing Consortium.

56. Jayapal M, Melendez AJ. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(5-6):496–503.
57. Woodhead JL, Fallon R, Figueredo H, Langdale J, Malcom ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies KE. *Human genetic diseases - a practical approach*. Oxford: IRL Press Limited; 1986. p.51-64.
58. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci*. 1977;74(12):5463-7.
59. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*. 1987;238(4825):336-41.
60. Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP et al. Interpreting Missense Variants: Comparing Computational Methods in Human Disease Genes *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *MECP2*, and Tyrosinase (*TYR*). *Human Mutation*. 2007;28(7):683- 93.
61. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat*. 2011;32(4):358-68.
62. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673- 80.
63. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2005;33:D154-159.
64. Neshich G, Togawa RC, Mancini AL, Kuser PR, Yamagishi ME, Pappas G Jr et al. STING Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3386-92.

65. Meng Z, Lou Z, Liu Z, Li M, Zhao X, Bartlam M et al. Crystal structure of human pyrroline-5-carboxylate reductase. *J.Mol.Biol.* 2006;359:1364-77.
66. Souto LR, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MH, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *São Paulo Med. J* 2006;124(2):71-6.
67. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA-sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(11):5022-6.
68. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank Products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters.* 2004;573:83-92.
69. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20:307-15.
70. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
71. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3.
72. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
73. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):research0034.

74. Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S. Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol.* 2010;14;11:59.
75. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method. Methods.* 2001;25:402-08.
76. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249-64.
77. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis, Series: Springer Series in Statistics*, 2nd ed., Springer, NY, XXIX, 487 p. 28, 2002.
78. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMBRep.* 2008;41:11–22.
79. Lu B. Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2009;9:212–19.
80. Soubannier V, McBride HM. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:154–70.
81. Bicknell LS, Pitt J, Aftimos S, Ramadas R, Maw MA, Robertson SP. A missense mutation in *ALDH18A1*, encoding Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase (*P5CS*), causes an autosomal recessive neurocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:1176–86.
82. Roumier A, Olivo-Marin JC, Arpin M, Michel F, Martin M, Mangeat P et al. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity.* 2001;15: 715-28.
83. Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltzer PS, Merlino G. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental

homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nature Med.* 2004;10:175-81.

84. Mykkanen OM, Gronholm M, Ronty M, Lalowski MJ, Salmikangas P, Suila H et al. Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Molec. Biol.* 2001;Cell 12:3060-73.
85. Zimmermann N, Doepker MP, Witte DP, Stringer KF, Fulkerson PC, Pope SM et al. Expression and regulation of small proline-rich protein 2 in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(5): 428-35.
86. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005;437:369-75.



ANEXOS

Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 21/09/04.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 409/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO COM GENES CANDIDATOS PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA RECESSIVA TIPO II (CUTIS LAXA COM DÉFICIT DE CRESCIMENTO E DE DESENVOLVIMENTO), “SÍNDROME DA PELE ENRUGADA” OU GERODERMIA OSTODISPLÁSICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Eduardo Steiner

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 20/05/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/09/05

II - OBJETIVOS

Testar duas famílias não aparentadas com quadro clínico típico de ARCL tipo II, "síndrome da pele enrugada" ou gerodermia osteodisplásica para dois genes candidatos a essa condição.

III - SUMÁRIO

Os sujeitos da pesquisa serão dois pacientes já conhecidos do Ambulatório de Genética Médica e seus familiares em primeiro grau. Serão coletadas amostras de sangue e uma biópsia de pele com a finalidade de se procurar um determinado gen que possa estar causando esta condição e esclarecer se a ARCL tipo II, a síndrome da pele enrugada e a gerodermia osteodisplásica são a mesma condição ou são doenças diferentes. A metodologia é adequada e o trabalho factível no prazo estipulado.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem fundamentado e seu resultado irá contribuir grandemente para o esclarecimento dos fatores etiológicos destas condições. Não há risco para os participantes. O TCLE está bem claro e conciso. Não há indicação do destino do material colhido e não há garantia de que este não seja usado em outro estudo.

Recomendação: A garantia de que o material colhido só será usado neste estudo e que, caso outro estudo venha a utilizar este material, novo TCLE será elaborado, deve constar claramente no TCLE atual e apresentado ao CEP uma declaração com o mesmo conteúdo.

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 IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de setembro de 2004.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/07/09.
(PARECER CEP: N° 409/2004)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO COM GENES CANDIDATOS PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA RECESSIVA TIPO II (CUTIS LAXA COM DÉFICIT DE CRESCIMENTO E DE DESENVOLVIMENTO),"SÍNDROME DA PELE ENRUGADA" OU GERODERMIA OSTODISPLÁSICA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Eduardo Steiner

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui os genes *ATP6V0A2* e *SCYL1BP1*, referente ao 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.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de julho de 2009.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo 3



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/10/09.
(PARECER CEP: Nº 409/2004)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO COM GENES CANDIDATOS PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA RECESSIVA TIPO II (CUTIS LAXA COM DÉFICIT DE CRESCIMENTO E DE DESENVOLVIMENTO), “SÍNDROME DA PELE ENRUGADA” OU GERODERMIA OSTODISPLÁSICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Eduardo Steiner

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a alteração do pesquisador responsável que passa a ser Daniel Zanetti Scherrer e a inclusão do gene PYCR1 que deverá ser estudado pelos seguintes métodos: amplificação por PCR dos genes candidatos; reação de sequenciamento automático; estudos de expressão gênica e PCR em tempo real, referente ao 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.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.


1/ Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187

Anexo 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Estudo das bases moleculares para cutis laxa autossômica recessiva tipo II

Responsável: Dr. Carlos Eduardo Steiner

Descrição: Este projeto visa estudar genes candidatos (ou seja, possivelmente responsáveis) por causar a doença presente em minha pessoa ou em meu filho / minha filha.

Procedimentos: Para o estudo desses genes, será necessário doar amostras de sangue e de pele, sendo que a primeira é feita com uma coleta comum de sangue (cerca de 20 a 30 ml) e a segunda é feita por uma biópsia de uma amostra de pele menor que 1 cm.

Aspectos éticos:

- Voluntariedade e autonomia: é assegurado que a participação nesse estudo é voluntária e que se optar por não participar do estudo não haverá prejuízo no meu atendimento regular no Hospital de Clínicas da Unicamp.
- Sigilo, confidencialidade e privacidade: é garantido que os dados obtidos deste estudo serão mantidos em sigilo e que os resultados finais, quando divulgados em eventos científicos ou publicações, não conterão meu nome ou meu número de registro do Hospital.
- Proteção da imagem: é garantido que a minha participação no estudo não trará prejuízos como estigmatização, desprestígio ou prejuízos financeiros.
- Descontinuidade: é garantido que eu posso retirar meu consentimento a qualquer momento durante a participação neste estudo, sem prejuízo para meu atendimento no Hospital de Clínicas da Unicamp.
- Vantagens e beneficência: foi explicado que minha participação neste estudo não trará nenhum tipo de vantagem diretamente para minha pessoa, mas sim que os conhecimentos obtidos poderão ajudar a entender essa doença o que, no futuro, poderá ajudar a minha família e outras pessoas.
- Riscos: foi explicado que os riscos que podem ocorrer se referem à coleta de sangue (como dor, inchaço e hematoma no local da punção, todos de curta duração e sem complicações posteriores) e à coleta de pele que será feita na forma de biópsia, ou seja, com anestesia local e podendo resultar em uma pequena cicatriz menor que 1 cm de diâmetro (eventualmente pode haver infecção no local, sendo que o tratamento é simples e feito com uso de antibióticos).

- Ressarcimento em caso de dano: foi explicado que não está previsto o ressarcimento em caso de danos nos procedimentos a serem realizados (coleta de sangue e biópsia de pele) e que esses procedimentos serão realizados sem custos para minha pessoa. Se houver necessidade de tomar remédios (como antibióticos), eles serão fornecidos pelo SUS conforme disponibilidade na farmácia do Hospital de Clínicas. Entendo que as despesas de transporte até o Hospital de Clínicas da Unicamp serão de minha responsabilidade na ocasião das consultas médicas que poderão ocorrer.

Em caso de dúvidas ou reclamações, posso contatar o Dr. Carlos Eduardo Steiner pelos telefones (19) 3521-8903 ou 3521-8908 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp pelo telefone (19) 3521-8936.

Após ler este termo de consentimento e ter respondido minhas dúvidas com o pesquisador, concordo em participar do estudo.

Assinatura: _____

Nome e RG do paciente: _____

Após ler este termo de consentimento e ter respondido minhas dúvidas com o pesquisador, concordo que meu filho / minha filha participe deste estudo.

Nome do paciente (e parentesco): _____

Assinatura do responsável legal: _____

Nome e RG do responsável legal: _____

Asseguro que li e expliquei este termo de consentimento livre e esclarecido para a pessoa identificada acima e que forneci uma cópia do mesmo para ela. Declaro não haver conflito de interesse entre o pesquisador e os sujeitos da pesquisa ou o patrocinador do projeto.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Anexo 5

Lista dos 90 genes diferencialmente expressos comparados por pele fresca e fibroblastos.

Nº	Gene	ID	FC_P	FC_F	Localização
1	ABCA5	213353_at	1,21	-1,08	chr17q24,3
2	ACADM	202502_at	1,38	-1,16	chr1p31
3	ALCAM	201951_at	1,28	-1,87	chr3q13,1
3	ALCAM	201952_at	1,37	-1,46	chr3q13,1
4	ATF5	204998_s_at	-1,18	-3,02	chr19q13,3
4	ATF5	204999_s_at	-0,98	-2,76	chr19q13,3
5	ATP2A3	213036_x_at	-0,8	1,02	chr17p13,3
5	ATP2A3	207522_s_at	-1,08	0,83	chr17p13,3
6	C15orf48	223484_at	-1,33	-1,05	chr15q21,1
7	C19orf28	220178_at	0,89	0,75	chr19p13,3
8	CAMKK2	213812_s_at	1,42	0,75	chr12q24,2
9	CCDC14	225017_at	1,4	-1,70	chr3q21,1
10	CCDC86	203119_at	0,87	0,93	chr11q12,2
11	CES1	209616_s_at	-1,01	1,57	chr16q13-q22,1
12	CLIC6	227742_at	-1,11	2,77	chr21q22,12
13	CLK1	214683_s_at	1,13	-1,23	chr2q33
14	CMAH	205518_s_at	-0,87	-1,02	chr6p21,32
15	CNKSR3	227481_at	1,16	0,91	chr6q25,2
16	CROP	203804_s_at	1,42	-1,6	chr17q21,33
16	CROP	208835_s_at	1,44	-1,47	chr17q21,33
17	CTHRC1	225681_at	1,13	-1,66	chr8q22,3
18	CXorf10	228752_at	-0,88	1,43	chrXq26
19	CYorf15B	223646_s_at	0,97	-1,23	chrYq11,222
20	DDX3Y	205000_at	1,03	-0,37	chrYq11
21	DNER	226281_at	-1,61	-2,67	chr2q36,3
22	EFHA1	212410_at	1,41	-1,01	chr13q12,11
23	EZR	217234_s_at	1,1	1,02	chr6q25,2-q26

Nº	Gene	ID	FC_P	FC_F	Localização
24	FAM126A	227239_at	1,23	-1,03	chr7p15,3
25	FAM3C	201889_at	1,74	-1,37	chr7q31
26	FLJ40113	213212_x_at	1,19	-1,04	chr15q25,2
27	FOXQ1	227475_at	-0,87	-1,13	chr6p25
28	G0S2	213524_s_at	-0,94	-1,13	chr1q32,2-q41
29	GSTT1	203815_at	3	1,90	chr22q11,23
30	GTPBP5	226606_s_at	1,72	1,62	chr20q13,33
31	HES1	203394_s_at	-0,95	-1,57	chr3q28-q29
32	HNRNPA2B1	225107_at	1,6	-2,41	chr7p15
32	HNRNPA2B1	225932_s_at	1,32	-1,22	chr7p15
33	HNRPDL	212454_x_at	1,65	-1,48	chr4q13-q21
34	HSP90B1	200599_s_at	1,05	-1,51	chr12q24,2-q24,3
35	HSPB8	221667_s_at	-1,18	0,85	chr12q24,23
36	IFI6	204415_at	-1,06	-1,64	chr1p35
37	IKZF2	231929_at	-0,85	-1,29	chr2q34
38	KCNN4	204401_at	-0,79	-1,02	chr19q13,2
39	KIAA1109	212779_at	1,44	-2,00	chr4q27
40	KRT18	201596_x_at	-0,8	1,72	chr12q13
41	KRT19	201650_at	-2,65	3,25	chr17q21,2
42	KRT33A	208483_x_at	-1,06	1,76	chr17q12-q21
43	KRT7	209016_s_at	-1,26	1,36	chr12q12-q13
44	KRTAP1-1	220976_s_at	-1,8	-1,15	chr17q12-q21
45	KRTAP1-5	233533_at	-1,8	-1,11	chr17q12-q21
46	LNX1	223611_s_at	-0,98	1,50	chr4q12
47	LOC284702	225786_at	1,61	-2,72	chr1q44
48	LOC654433	228425_at	-1,5	-1,90	chr2q13
48	LOC654433	227474_at	-2,54	-1,52	chr2q13
49	LOC90784	228515_at	1,24	1,40	chr2p11,2
50	MGC9913	244741_s_at	-0,99	3,36	chr19q13,43
51	MMP1	204475_at	1,85	-1,53	chr11q22,3
52	MX1	202086_at	-0,93	-1,53	chr21q22,3
53	NDUFA5	201304_at	1,19	-1,11	chr7q32
54	NKTR	215338_s_at	0,97	-1,52	chr3p23-p21

Nº	Gene	ID	FC_P	FC_F	Localização
55	ORAI1	226531_at	-0,76	0,75	chr12q24,31
56	PALLD	200906_s_at	1,09	1,91	chr4q32,3
57	PARVB	37966_at	1,45	1,35	chr22q13,2-q13,33
58	PARVB	204629_at	0,84	0,79	chr22q13,2-q13,33
59	PCMTD1	226119_at	1,55	-1,26	chr8q11,23
60	PDE4DIP	205872_x_at	-1	-1,79	chr1q12
61	PLXNC1	213241_at	1,32	1,63	chr12q23,3
62	PRO1933	223839_s_at	0,91	1,02	chr10q24,31
63	PRPF39	220553_s_at	1,28	-1,86	chr14q21,3
64	PRPF40A	233080_s_at	1,36	-1,13	chr2q23,3
65	PSD3	203354_s_at	-0,68	-0,85	chr8pter-p23,3
66	PSG4	208191_x_at	-0,94	1,37	chr19q13,2
67	PSPH	205048_s_at	-1,04	-1,61	chr7p15,2-p15,1
68	PTAR1	235484_at	0,82	-1,63	chr9q21,11
69	RAB12	235059_at	2,13	0,92	chr18p11,22
70	RICTOR	226312_at	1,41	-1,84	chr5p13,1
71	RUNX3	204197_s_at	-0,87	2,60	chr1p36
72	S100A3	206027_at	1,22	1,37	chr1q21
73	SCD	200832_s_at	0,93	1,06	chr10q23-q24
74	SFRP2	223122_s_at	-1,07	1,75	chr4q31,3
75	SFRS18	212176_at	1,53	-2,14	chr6q16,3
75	SFRS18	212179_at	1,46	-1,95	chr6q16,3
76	SIRT2	1558331_at	0,91	0,88	chr19q13
77	SLC39A6	1556551_s_at	-0,83	-1,18	chr18q12,2
78	SMG1	224842_at	1,51	-1,06	chr16p12,3
79	SORD	201563_at	1,05	0,87	chr15q15,3
80	SPTLC1	1554053_at	0,84	1,24	chr9q22,2
81	STAG2	209023_s_at	1,06	-1,00	chrXq25
82	TFPI2	209278_s_at	2,07	-1,86	chr7q22
83	TMED5	202194_at	1,86	-1,38	chr1pter-q31,3
84	TTC3	208661_s_at	1,29	-1,10	chr21q22,2
85	UCP2	208998_at	0,82	1,67	chr11q13
86	WAC	219679_s_at	-0,82	-1,11	---

Nº	Gene	ID	FC_P	FC_F	Localização
87	XIST	221728_x_at	-0,25	-1,45	chrXq13,2
88	YES1	202932_at	1,26	-1,37	chr18p11,31-p11,21
89	ZNF207	228157_at	1,39	-1,5	chr17q11,2
90	ZRANB2	223716_s_at	1,48	-1,23	chr1p31

Legenda: ID, identificação da sonda; FC_P, coeficiente de variação comparado entre controle e indivíduo em pele fresca; FC_F, coeficiente de variação comparado entre controle e indivíduo em fibroblasto.