

DANIEL ZANETTI SCHERRER

**ESTUDOS COM GENES CANDIDATOS PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA TIPO II**

CAMPINAS

2007

DANIEL ZANETTI SCHERRER

***ESTUDOS COM GENES CANDIDATOS PARA CUTIS LAXA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA TIPO II***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. EDI LÚCIA SARTORATO

CAMPINAS

2007

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

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

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP
V. _____ EX. _____
TOMBO BCOL 74293
PROC 16.145-07
IC _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 19-9-07
BIB-ID _____
BIB-ID _____

Sch28e

Scherrer, Daniel Zanetti

Estudos com genes candidatos para cutis laxa autossômica recessiva tipo II / Daniel Zanetti Scherrer. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Carlos Eduardo Steiner, Edi Lúcia Sartorato
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Cutis laxa. 2. Gerodermia osteodisplástica. 3. Síndrome da pele enrugada. 4. Biologia molecular. I. Steiner, Carlos Eduardo. II. Sartorato, Edi Lúcia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Studies with candidate genes for type II autosomal recessive cutis laxa

Keywords: • Cutis laxa
• Gerodermia Osteodysplastica
• Wrinkly skin syndrome
• Molecular Biology

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora: Prof Dr Carlos Eduardo Steiner
Prof Dr Victor Evangelista de Faria Ferraz
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

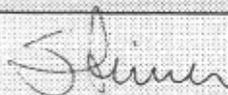
Data da defesa: 02 - 07 - 2007

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo Steiner

Membros:

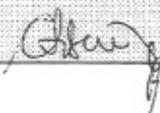
1. Carlos Eduardo Steiner



2. Victor Evangelista de Faria Ferraz



3. Carmen Silvia Bertuzzo



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

Data: 02/07/2007

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Marina, pelo incomparável apoio e carinho, imprescindíveis na definição e orientação dos caminhos, dos atalhos e dos sentidos com que o meu percurso de vida se vai trilhando.

A Lilian, cujo incentivo, dedicação, paciência, amor e companheirismo foram indispensáveis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bênção de viver.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner, pela amizade, dedicação, paciência, confiança e conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento da tese.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato, pela valiosa colaboração e apoio que muito contribuiu na realização deste trabalho.

Aos Doutores, Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, Carmen Sílvia Bertuzzo, Victor Evangelista de Faria Ferraz e Mônica Barbosa de Melo, pelo aceite imediato em participar na banca examinadora desta tese.

A Profa. Maricilda Palandi de Mello por toda ajuda e apoio no CBMEG.

Aos funcionários do CBMEG e do Departamento de Genética Médica pela dedicação e por todo o trabalho que realizaram.

A amiga Fabiana Alexandrino, pela sua amizade e dedicação, sempre disposta a ajudar; sua colaboração na revisão das análises foram valiosas na conclusão deste trabalho.

A Fernanda Coeli, pela amizade e paciência.

Ao amigo Társis Antonio Paiva Vieira, pelos bons anos de convivência.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas do Laboratório, Zélo, Luiz Eduardo, Vanessa, Sueli, Paula, Jéssica, Paulo, Reginaldo, Flávia, Francine, Renan, Vítor, Renata, Fernanda Soardi, Regiane, Madá e aos amigos do departamento, Lucila, Luciana, Érika, Fabíola, Fábio, Rodrigo pelo convívio agradável durante estes anos.

Aos pacientes e suas famílias, por consentirem em suas participações neste estudo.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	17
1 - As várias formas de cutis laxa	18
2 - Gerodermia osteodisplástica e “síndrome da pele enrugada”	21
3 - Genes candidatos	26
OBJETIVOS	30
1 - Objetivo Geral	31
2 - Objetivo Específico	31
CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
1 - Indivíduo 1	33
2 - Indivíduo 2	36
3 - Indivíduo 3	39
4 - Extração de DNA genômico de sangue periférico	43
5 - Amplificação por PCR dos Genes Candidatos	44
6 - Purificação dos produtos de PCR	48
7 - Reação de seqüenciamento automático	49
8 - Análise de Restrição	50
8.1 - Enzima de restrição <i>Taq</i> I	51
8.2 - Enzima de restrição <i>Hinc</i> II	52
9 - Duplicação <i>in Tandem</i>	53
RESULTADOS	54
1 - Gene <i>LOX</i>	55
2 - Gene <i>FBLN5</i>	55
3 - Gene <i>FBLN4</i>	57
4 - Duplicação <i>in Tandem</i>	63
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO	67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	77
1 - Anexo 1	78
2 - Anexo 2	80

LISTA DE TABELAS

1 - Manifestações clínicas nas diferentes formas de cutis laxa congênita	21
2 - Comparação entre a condição descrita como CLAR tipo II e a SPE	24
3 - Diagnóstico diferencial entre GO e SPE	25
4 - Principais características clínicas CLAR tipo II, SPE e GO	42
5 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>LOX</i>	45
6 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>FBLN5</i>	46
7 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>FBLN4</i>	47
8 - Análises de restrição nos genes <i>FBLN4</i> e <i>FBLN5</i>	53
9 - Resumo das alterações encontradas nos genes <i>FBLN4</i> e <i>FBLN5</i>	62

LISTA DE FIGURAS

1 -	Heredograma do paciente 1	33
2 -	Paciente 1 com 16 anos de idade	35
3 -	Heredograma do paciente 2	36
4 -	Paciente 2, observa-se mãos com posições anormais dos dedos	37
5 -	Paciente 2 aos 10 anos de idade	38
6 -	Heredograma do paciente 3	39
7 -	Paciente 3. Nota-se aspecto senil da face e mãos	40
8 -	Microscopia eletrônica	41
9 -	Ciclo de amplificação dos genes candidatos	48
10 -	Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento automático	49
11 -	Representação esquemática da análise de restrição da alteração I315I no gene <i>FBLN5</i>	51
12 -	Representação esquemática da análise de restrição da alteração I259V no gene <i>FBLN4</i>	52
13 -	Fotografia do gel de agarose 1,0% no qual foram testadas as amostras de PCR do gene <i>LOX</i>	55
14 -	Produto de amplificação do gene <i>FBLN5</i> em eletroforese de gel de agarose 1%	56
15 -	Eletroferograma mostrando mutação silenciosa I315I	56
16 -	Análise de restrição para alteração I315I com enzima <i>Taq I</i> no gene <i>FBLN5</i>	57
17 -	Produto de amplificação do gene <i>FBLN4</i> em eletroforese de gel de agarose 1,0%	57
18 -	Eletroferograma demonstrando alteração I259V no gene <i>FBLN4</i>	58
19 -	Análise de restrição para a mutação I259V no gene <i>FBLN4</i> com a enzima <i>Hinc II</i>	59
20 -	Eletroferograma mostrando a alteração do aminoácido H92H do gene <i>FBLN4</i>	60

21 - Eletroferograma mostrando a alteração IVS5+23 G>C do gene <i>FBLN4</i>	60
22 - Eletroferograma mostrando a alteração IVS7+55 T>C do gene <i>FBLN4</i>	61
23 - Eletroferograma mostrando a alteração IVS10-33 C>T do gene <i>FBLN4</i>	62
24 - Fotografia do gel de agarose 1% no qual foram testadas as amostras da duplicação <i>in tandem</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Autossômico dominante
AR	Autossômico recessivo
CLAR	Cutis laxa autossômica recessiva
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
dNTPs	Desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F	<i>Forward</i>
<i>FBLN4</i>	Gene da Fibulina 4
<i>FBLN5</i>	Gene da Fibulina 5
GO	Gerodermia Osteodisplástica
<i>LOX</i>	Gene da Lisil Oxidase
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PSA	Persulfato de amônia
R	<i>Reverse</i>
RLX	Recessivo ligado ao X
rpm	Rotações por minuto
RSB	Tris/KCl/MgCl
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (<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
U	Unidade



RESUMO

Cutis laxa é um distúrbio raro do tecido conectivo em que a pele perde sua firmeza, cedendo excessivamente e conferindo ao indivíduo um aspecto envelhecido. Dentre as formas geneticamente determinadas, há uma de herança autossômica dominante, uma de herança ligada ao X e três de herança autossômica recessiva. Sugere-se que cutis laxa autossômica recessiva tipo II ou cutis laxa com déficit de crescimento e de desenvolvimento seja a mesma entidade descrita com as denominações de “síndrome da pele enrugada” e gerodermia osteodisplástica. Tal confusão quanto à nomenclatura é, em parte, causada pelo desconhecimento de suas bases biológicas. Recentemente se definiu que a cutis laxa autossômica recessiva tipo I é causada por mutações nos genes *FBLN4* e *FBLN5*, localizados nos cromossomos 11q13.1 e 14q32.1, respectivamente. Por outro lado, dois indivíduos com cutis laxa descritos na literatura apresentaram alterações da lisil oxidase, codificada pelo gene *LOX* localizado em 5q23. Deste modo, o presente estudo visou analisar três famílias não aparentadas com quadro típico de cutis laxa autossômica recessiva tipo II, “síndrome da pele enrugada” ou gerodermia osteodisplástica para mutações nos genes *LOX*, *FBLN4* e *FBLN5*. Para tanto, foram obtidas amostras de DNA genômico a partir de linfócitos do sangue periférico, utilizando métodos descritos na literatura pertinente. Todos os genes candidatos tiveram suas regiões codificantes amplificadas e submetidas à análise de seqüenciamento direto. Nenhuma mutação que caracterizasse o fenótipo foi encontrada nesses genes. Assim, o presente estudo excluiu os genes *LOX*, *FBLN4* e *FBLN5* como responsáveis para essa forma de cutis laxa nessas famílias.



ABSTRACT

Cutis Laxa is a rare disorder of connective tissue in which the skin sags excessively, giving to the individual an aged aspect. Concerning the genetic forms, there is an autosomal dominant, an X-linked recessive, and three autosomal recessive conditions. It has been suggested that type II autosomal recessive cutis laxa or cutis laxa with growth and developmental delay is the same entity described with the denominations of wrinkly skin syndrome and geroderma osteodysplastica. Such confusion is caused, in part, by the fact that its biological basis remains unknown. Recently, type I autosomal recessive cutis laxa has been associated with mutations in *FBLN4* and *FBLN5* genes located on 11q13 and 14q32, respectively. On the other hand, some patients with cutis laxa show abnormalities in lysyl oxidase, coded by the *LOX* gene located on 5q23. In this way, the present study analyzed three unrelated families with typical picture of type II autosomal recessive cutis laxa, “wrinkly skin syndrome” or geroderma osteodysplastica for mutations in *LOX*, *FBLN4*, and *FBLN5* genes. Molecular studies were performed in genomic DNA samples from peripheral blood. All codifier regions of the three candidate genes were amplified and submitted to direct sequence analysis. No mutation that characterized the phenotype was found in the genes. Thus, the present study excluded *LOX*, *FBLN4* and *FBLN5* as responsible for this form of cutis laxa in these families.



INTRODUÇÃO

1. As várias formas de cutis laxa

A pele redundante congênita 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 (Steiner et al 2005).

Cutis laxa é, portanto, definida como a pele que parece estar inadequadamente aderida aos tecidos vizinhos e em todas as partes do corpo, podendo ceder excessivamente, dando ao indivíduo um aspecto envelhecido. 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 (Fitzsimmons et al 1985, Der Kaloustian 1993, Imaizumi et al 1994).

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 (Reed et al 1971, Koch e Williams 1985, Riveros et al 2004).

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 abdômen, 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 (Fitzsimmons et al 1985, Imaizumi et al 1994), além de diversas outras condições nas quais a cutis laxa pode ocorrer dentro de um quadro sindrômico (Der Kaloustian 1993).

A forma autossômica dominante de cutis laxa (OMIM 123700) tem repercussão basicamente de ordem estética, com doença leve, de início tardio, ausência de manifestações sistêmica e bom prognóstico, com expectativa de vida normal (Beighton 1972, Marchase et al 1980). Embora provavelmente tenha sido descrita pela primeira vez por Rossbach (1884)¹, 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 a 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 (Byers et al 1980, Tsukahara et al 1994, Gorlin et al 2001).

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 (Agha et al 1978, Imaizumi et al 1994).

A CLAR tipo II, também chamado “cutis laxa com distrofia óssea” ou “cutis laxa com déficit de crescimento e de desenvolvimento” (OMIM 219200), termo cunhado por Debré et al (1937), 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

¹ Rossbach *apud* Gorlin et al 2001

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 (Agha et al 1978, Allanson et al 1986, Patton et al 1987, Imaizumi et al 1994, Steiner et al 2005).

Em relação aos aspectos cutâneos, ocorre o aspecto típico de pele frouxa e pendular, especialmente no dorso, abdome e extremidades dos membros. As veias superficiais do abdômen são notadamente visíveis e o músculo abdominal é frouxo (Agha et al 1978, Allanson et al 1986, Patton et al 1987, Imaizumi et al 1994, Steiner et al 2005). Achados histológicos incluem agregação, fragmentação e deformidade das fibras elásticas (Sakati et al 1983, Steiner et al 2005).

A CLAR tipo III, também chamado “síndrome de De Barys” (OMIM 219150) associa a cutis laxa a 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 (Pontz et al 1986, Patton et al 1987, Karnes et al 1992).

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 2004).

Manifestações Clínicas	AD	AR	AR	AR	RLX
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	
Início	Tardio	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, em 1950, 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 (Lisker et al 1979, Hunter et al 1989, Eich et al 1996).

Em 1973, Gazit et al 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 elástica (Boente et al 1999).

Tal sobreposição de achados clínicos e histológicos passou inadvertida na literatura durante muito tempo até que, em 1999, Zlotogora propôs que a CLAR tipo II e a SPE fossem a mesma condição. Dois anos mais tarde, Al-Gazali et al 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 freqüentemente descritos usando um termo que outro. Fontanelas grandes 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), que tem influenciado muito os autores subseqüentes. 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 (Steiner et al 2005).

Mais recentemente, surgiram novas controvérsias sobre essa sobreposição de sinais clínicos. O trabalho de Gupta e Phadke (2006), no qual são descritos três novos pacientes pertencentes a duas famílias de origem indiana com cutis laxa autossômica recessiva tipo II, volta a lançar dúvidas sobre o quanto essa condição e a SPE são, de fato, duas condições distintas. O trabalho de Boente et al (2006) 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, 2006).

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 1994; 2- Ogur et al 1990 paciente 1; 3- Ogur et al 1990 paciente 2; 4- Goldblatt et al 1988; 5- Casamassima et al 1987; Azuri et al 1999.

Tabela 3: Diagnóstico diferencial entre GO e SPE (modificado de Boente et al 2006).

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	Retardado
Habilidade motora	Demorado	Hipotonia – levemente retardado
Articulações	Hipermotilidade de articulações das extremidades Diminuição da extensão de cotovelos Peito escavado ou carenado	Frouxidão articular infreqüente?
Esqueleto	Cifose	Desconhecido
Características radiológicas	Osteopenia Fraturas Deformidades vertebrais Epífises em forma de cone Lingüeta 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.

Até agora, a designação mais freqüente é “cutis laxa”, que remete a um grupo heterogêneo de distúrbios da pele. Zlotogora (1999), no entanto, sugeriu o uso de “síndrome da pele enrugada” e desconsiderou o termo “cutis laxa com atraso de crescimento e desenvolvimento” sugerindo que estes pacientes não apresentam uma forma verdadeira de cutis laxa.

Até a presente data, pouco mais de 80 casos foram descritos na literatura, sendo mais da metade nomeados como CLAR tipo II, seguidos de GO e SPE, respectivamente, como denominações mais freqüentes. 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 criar uma denominação definitiva (Steiner et al 2005, Gupta e Phadke 2006).

3. Genes candidatos

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 (Tassabehji et al 1998, Zhang et al 1999) e no gene da fibulina 5 (*FBLN5*) (Markova et al 2003). A cutis laxa ligada ao cromossomo X é alélica à síndrome de Menkes, portanto causada por mutações no gene *ATP7A* (Das et al 1995). A CLAR tipo I foi recentemente identificada como relacionada a mutações no gene das fibulinas 4 e 5 (*FBLN4* e

FBLN5), nos cromossomos 11q13.1 e 14q32.1, respectivamente. Quanto à CLAR tipo III, não há, até o momento, gene candidato, o mesmo sendo válido para a CLAR tipo II, SPE ou GO.

Nesse sentido, Kreuz & Witwer (1993) descreveram mãe e dois filhos apresentando clinicamente cutis laxa, com sinais histológicos de fragmentação das fibras elásticas e uma deleção cromossômica em 2q32, sendo proposto o diagnóstico de SPE para essa família. Os autores notaram que nessa região estão localizados dois genes do colágeno, *COL3A1* e *COL5A2*, e os propuseram como genes candidatos para essa forma de cutis laxa.

Tal relato, entretanto, mostra uma forma atípica de cutis laxa quando comparado a outras publicações, com diferenças clínicas e também com um padrão de herança inconsistente com o modelo autossômico recessivo. Além disso, os genes *COL3A1* e *COL5A2* têm expressão em pele, vasos, útero, placenta e vilosidade coriônica, não sendo expressos em ossos (Byers 1995) e os achados histológicos nessa condição têm demonstrado alterações de fibras elásticas, sendo as fibras colágenas normais, o que sugere ser pouco provável que tais genes do colágeno sejam genes candidatos nessa forma de cutis laxa.

Por outro lado, Khakoo et al (1997) descreveram dois pacientes não aparentados, do sexo masculino e com achados clínicos e histológicos semelhantes entre si. Ambos apresentavam deficiência de lisil oxidase, uma enzima codificada pelo gene *LOX* (OMIM 153455), localizada em 5q23. 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 enrugada e frouxa generalizada, frouxidão articular, luxação do quadril, osteoporose e ossos Wormianos, além de consangüinidade parental em um dos casos, nos sugere que esses pacientes representam descrições adicionais de CLAR tipo II, SPE ou GO.

Até o momento, o gene *LOX* não havia sido estudado em nenhum paciente portador das formas CLAR. A lisil oxidase é uma enzima extracelular dependente de cobre, envolvida no *cross-linking* do colágeno e elastina por catálise oxidativa, desaminando o grupo amino de peptídeos de lisina e hidroxilisina do colágeno e

resíduos de lisina da elastina (Hamalainen et al 1993, Szauter et al 2005). Esse *cross-linking* no colágeno é essencial para o mecanismo de estabilidade e elasticidade das fibras (Hofer et al, 2004).

O gene *LOX* tem aproximadamente 5 kb, consiste em sete exons e sua seqüência gênica codifica um peptídeo de 417 aminoácidos (Hamalainen et al 1993). Mariani et al (1992) relataram que 88% dos aminoácidos e 83% dos nucleotídeos são conservados entre humanos e murinos. Ainda com relação a esse gene, a análise por Northern blot em RNA de fibroblastos humano indicou que a hibridização do cDNA apresentou quatro tipos de mRNA, de tamanhos aproximadamente 5.5, 4.3, 2.4 e 2.0 kb. Svinarich et al (1992) demonstraram que esses múltiplos transcritos de mRNA são originários de um único gene, como produtos de “splicing” alternativos.

Considerando o que foi exposto, especialmente com relação ao trabalho de Khakoo et al (1997), tal gene torna-se um forte candidato a ser o responsável pela CLAR tipo II.

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 (2002), descreveram uma extensa família de origem turca com CLAR tipo I e encontraram indivíduos homocigotos afetados para a mutação S227P no gene da fibulina 5 (*FBLN5*, *EVEC* ou *DANCE*; OMIM 604580). No ano seguinte, Markova et al (2003) analisaram a expressão da elastina e das fibulinas 1 a 5 nos fibroblastos de cinco pacientes com cutis laxa autossômica dominante, observando uma duplicação *in tandem* no gene da fibulina 5, em heterocigose, em um dos pacientes.

As fibulinas foram reconhecidas como uma família de proteínas de matriz extracelular com seis membros conhecidos. As fibulinas interagem com diversas proteínas de matriz extracelular, incluindo componentes de membranas e fibras elásticas (Argraves 2003, Timpl 2003).

Assim, há fortes indícios de que a fibulina 5 tem um papel importante no desenvolvimento das fibras elásticas em humanos e seja responsável por diferentes fenótipos de cutis laxa. O gene *FBLN5* apresenta 11 exons e codifica

448 aminoácidos, secretando uma proteína com massa molecular de 66 KD, sendo sua seqüência de aminoácido idêntica a de murinos em 94% (Nakamura 1999).

Além das alterações na fibulina 5, o trabalho recente de Huchtagowder et al (2006) 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. Embora os autores não tenham especificado a qual forma dentre as autossômicas recessivas pertence, a descrição clínica desse paciente sugere tratar-se do tipo I. O gene *FBLN4* consiste de 12 exons, dos quais o primeiro e o último não são traduzidos, codificando uma proteína com 443 aminoácidos (Giltay 1999, Gallagher 2001). Assim, um segundo gene dentro da família das fibulinas foi envolvido com as formas autossômicas recessivas de cutis laxa.

Em conclusão, a CLAR tipo II é uma condição clínica pouco estudada, havendo dúvidas quanto ao fato de se tratar ou não de uma entidade distinta das GO e da SPE. Tal confusão será definitivamente respondida a partir da descoberta das bases biológicas, incluindo o(s) gene(s) mutado(s) nesses pacientes. Além disso, estudos mais recentes têm demonstrado a participação de alterações nas fibulinas, a partir de indivíduos com CLAR tipo I. Deste modo, o estudo de tais genes em sujeitos com outras formas de CLAR poderá elucidar as dúvidas quanto ao diagnóstico clínico e fisiopatologia desse grupo de distúrbios.



OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Rastrear mutações em genes candidatos da CLAR tipo II, SPE ou GO.

2. Objetivo específico

Seqüenciar os exons dos genes *LOX*, *FBLN4* e *FBLN5* a partir de DNA de indivíduos com sinais clínicos da CLAR tipo II e seus familiares, descrevendo as alterações eventualmente identificadas em tais genes.



***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, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde), realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, com a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos participantes (anexos 1 e 2).

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, radiológicos e histológicos.

Parte da casuística (indivíduos 1 e 2) foi previamente descrita na literatura (Steiner et al 2005).

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 consangüíneos (primos em primeiro grau), descendentes de portugueses, afro-brasileiros e ameríndios (Figura 1). Seu peso ao nascimento era 2.100 g, medindo 41 cm, perímetro cefálico de 29 cm (todos abaixo do terceiro percentil) e o escore de Apgar foi 7/8.

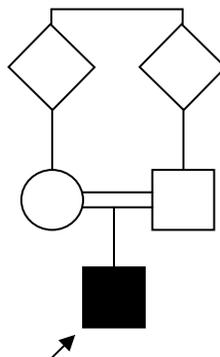


Figura 1: Heredograma do paciente 1.

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 sangüíneos superficiais, eram visíveis sob a pele fina. Outras características incluíram uma fronte alta, occipital proeminente, rosto triangular, orelhas antevértidas 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.

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, geno 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 freqüente uma escola para crianças com necessidades especiais. Aos 16 anos de idade, o aspecto senil do rosto e mãos era significativo (figura 2).

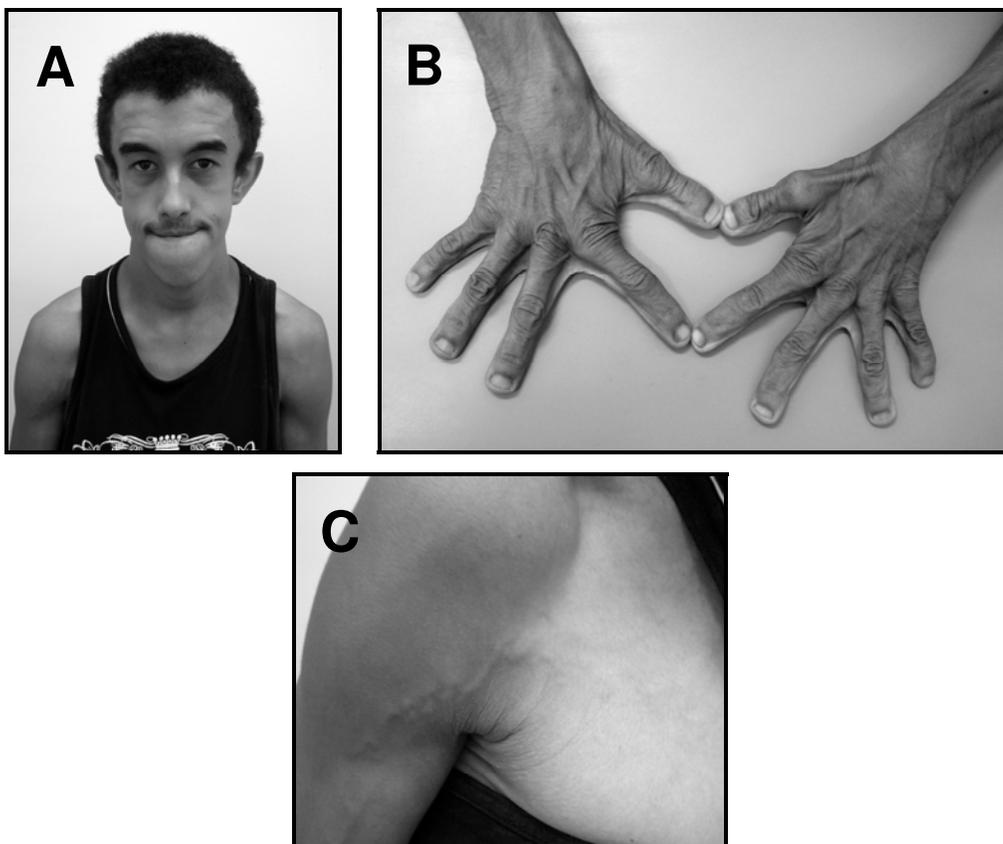


Figura 2: Paciente 1 com 16 anos de idade. Nota-se aspecto senil da face (A) e mãos (B), além de veias superficiais e tortuosas em região peitoral (C).

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 consangüíneos (primos em primeiro grau) descendentes de portugueses, afro-brasileiros e ameríndios (figura 3). 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).

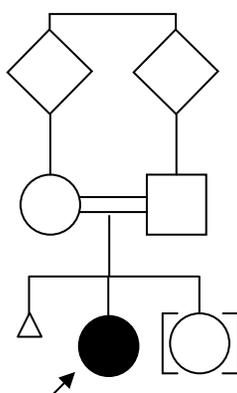


Figura 3: Heredograma do paciente 2.

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 sangüíneos 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, fóvea coccigea, hérnias umbilical e inguinal à direita, hipoplasia de grandes lábios, hiperextensibilidade de pequenas articulações com posição anormal dos quirodáctilos (figura 4) e cabelo fino e esparso. Aos seis meses de idade foi notada luxação de quadril e hipotonia muscular. A fontanela anterior fechou aos dois anos de idade.



Figura 4: Paciente 2 aos quatro meses de idade. Observa-se mãos com posições anormais dos dedos.

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, sendo que o prognatismo tornou-se evidente (figura 5) 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 presente momento. Não apresenta nenhuma história de fraturas e nem desproporção de segmentos corporais. Atualmente a paciente encontra-se com 14 anos de idade.

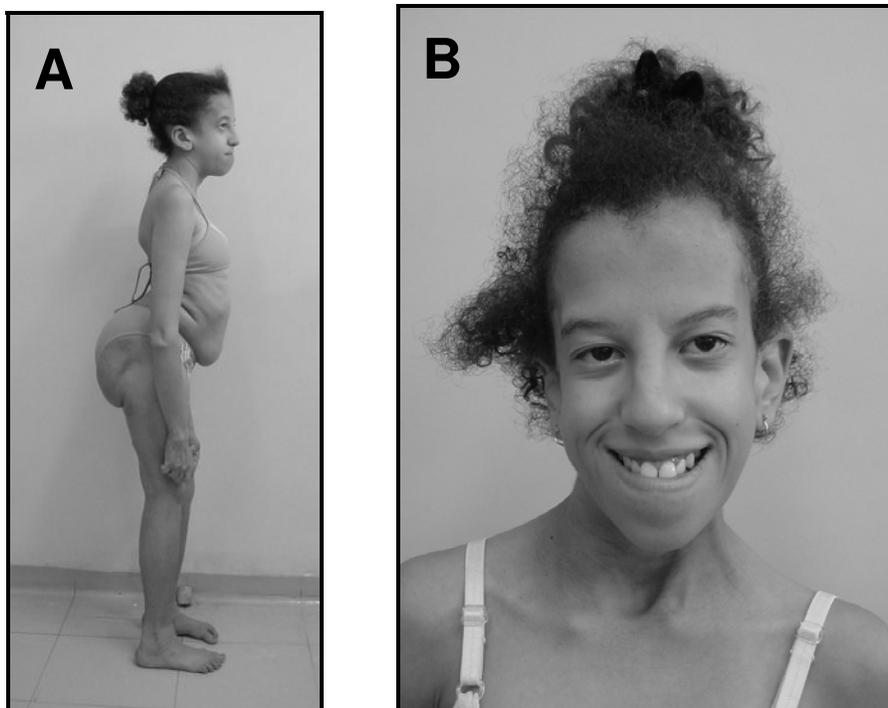


Figura 5: Paciente 2 aos 10 anos de idade. Nota-se abdome proeminente, lordose lombar e prognatismo (A) além de aspecto facial envelhecido (B).

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 raios 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.

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 consangüíneo G2P1A1 de ancestralidade portuguesa, afro-brasileira e ameríndia, tendo um casal de meio-irmãos paternos, saudáveis. Nega casos semelhantes na família (figura 6).

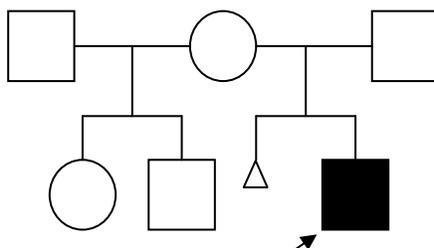


Figura 6: Heredograma do paciente 3.

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 7A), 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 7B), com aumento do pregueamento e veias superficiais proeminentes, além de diminuição da gordura subcutânea.

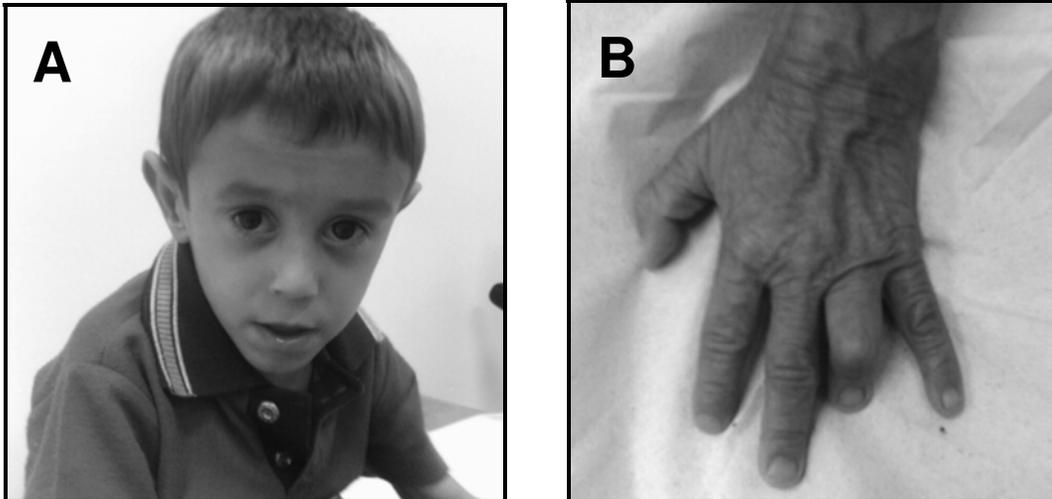


Figura 7: Paciente 3 aos quatro anos. Nota-se aspecto senil da face (A) e mãos (B).

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 8).

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

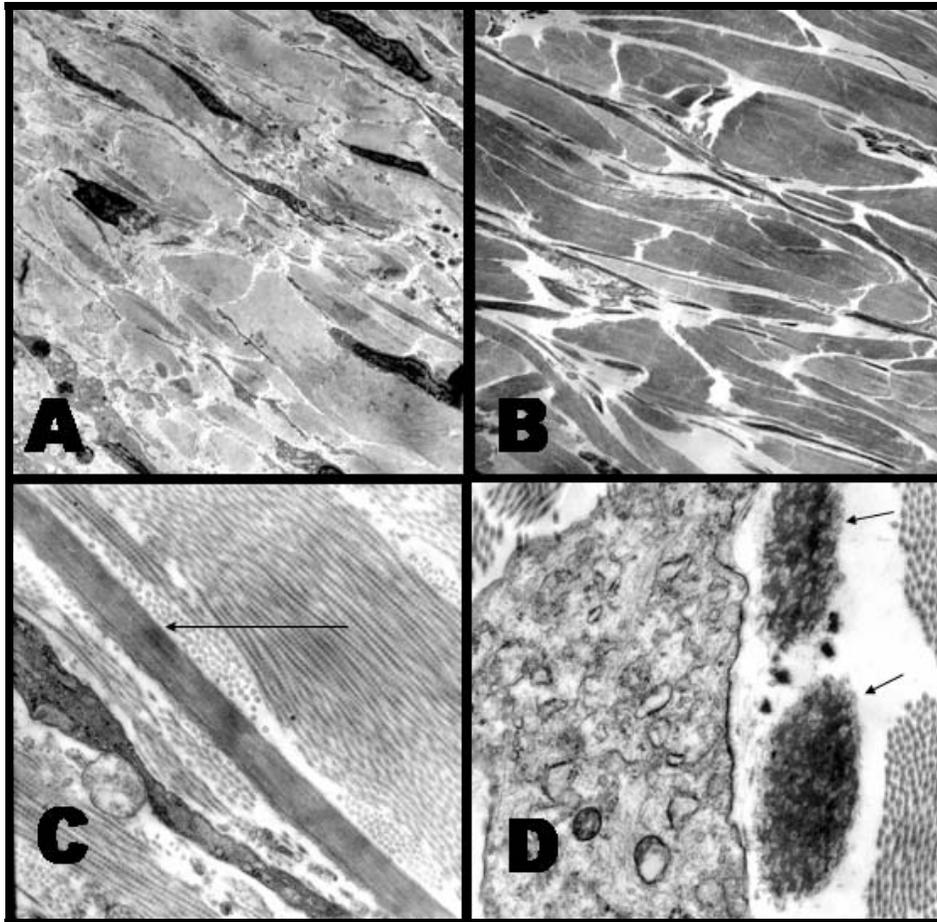


Figura 8: Cutis laxa, pele de tronco do indivíduo 3 (B e D). Pele de indivíduo controle pareado por sexo e idade (A e C). Diminuição da quantidade de fibras elásticas (B). Fragmentação e aglutinação do componente microfibrilar e elastina diminuído (D) (Microscopia eletrônica de transmissão. Ampliação original A: 3150x; B: 1670x; C: 20000x; D: 12500x).

A tabela 4 apresenta, comparativamente, os achados de exame clínico entre os indivíduos 1 a 3 e outros da literatura, previamente revisados por Steiner et al (2005).

Tabela 4 - Principais características clínicas CLAR tipo II, SPE e GO (modificado de Steiner et al 2005).

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 sangüíneos 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 *LOX*, *FBNL4* e *FBNL5*. Para tanto foram colhidas amostras de sangue periférico para obtenção de DNA genômico, o qual foi posteriormente utilizado para amplificação e seqüenciamento dos genes, 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 1986, 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 sangüíneas foram transferidas para um tubo de propileno com fundo cônico. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1X (Tris pH 7,6 0,001M, KCl 0,0005M e MgCl 0,001M) até completar um volume de 11 ml e 60 µl de Nonidet P40[®] (UBS Corporation, Cleveland, USA) 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° 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, homogeneizou-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 de vidro. 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 a 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.

5. Amplificação por PCR dos Genes Candidatos

Após a obtenção do DNA genômico dos pacientes e genitores, deu-se início à amplificação das seqüências correspondentes aos sete exons do gene *LOX* (Ensembl, número de acesso ENSG00000113083) por meio da reação em cadeia da polimerase, PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*). Para tanto foram utilizados as seqüências de 11 pares de *primers* descritos na tabela 5 desenhados com o auxílio do software generunnerTM versão 3.05, a seqüência utilizada para o exon 2 é descrita por Hofer et al (2004). O exon 1 foi dividido em quatro partes para a amplificação, enquanto o exon 7 foi dividido em duas partes. Os *primers* ou iniciadores são oligonucleotídeos sintéticos a partir do qual os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPS) são incorporados e dão início à elongação da cadeia de DNA respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G).

Tabela 5: Seqüência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *LOX*.

Exon	<i>Primers</i> 5' → 3'	TA (°C)	Produto de PCR
1a	F- GTCTCAGGATGTGTGTTCCG R- CACGTGAGGGAAGGAGAAATC	54	441 pb
1b	F- GTGGAGACTGAGATACCCG R- CAGGCTCAGCAAGCTGAAC	57	315 pb
1c	F- CCAGCAGATCCAATGGGAG R- GGTTACTGAGCGCAGGAAC	56	341 pb
1d	F- GCTGGCTACTCGACATCTAG R- CACGTGCGAGAAGCCACATAG	55	321 pb
2	F- CCGGGCGTCCCCAGTTCT R- CCAGCTCTTGTCCCCTTCCTAAC	61	380 pb
3	F- GAAAGGAGGATTGTCACTAC R- CCTTCAGGTAAGAAATAAGAC	55	337 pb
4	F- CTCTGTATGTAAGTACCACC R- CTCTCTGAGGCTTGAGGTTC	62	246 pb
5	F- TCATAGTCTGACCACATACC R- CATTGGAATCCAGAGAAGAG	58	220 pb
6	F- GTCTCCAGAGTTTAACCAC R- GTAGCAGAAACAGATACATTC	55	339 pb
7a	F- GAGGGAAACTGTTGCATAAAG R- CCAGTTATGTGCTTTGTTATTG	55	280 pb
7b	F- AACTCCCAATGGATAAATCAG R- TCTCAGCACAGATGTGTCC	57	483 pb

Legenda: F = *forward*, R = *reverse*; TA, temperatura de anelamento.

O Gene *FBLN5* possui 11 exons (Ensembl, número de acesso ENSG00000140092) e foi amplificado pela técnica de PCR com o auxílio dos *primers* descritos na tabela 6 desenhados com o auxílio do software generunner™ versão 3.05. O exon 11 foi dividido em três partes para a amplificação.

Tabela 6: Seqüência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *FBLN5*.

Exon	Sense 5' - 3'	TA (°C)	Produto de PCR
1	F- AACCAGGTGCTTGCGCTGAG R- TATCCTGACACCGCCTGAATC	57	332 pb
2	F- ATATCACCGTTACACGTCAC R- ACTGTAAAGCCACTCCCAC	57	263 pb
3	F- GTGTGAAATGACCTTGCCCTG R-CACTGCAACTGGGCTGAATG	58	152 pb
4	F- CCACTAATGCTCGCCCTTTC R- GGTGAGCATGCCAGATACAG	57	360 pb
5	F- AGGGCTCTAGATGGATGTG R- CCTGGCAACCGTTAACTTC	57	229 pb
6	F- GCAATCATGCCATGCTAGTGG R- CCAGGTGCTGAAGAAGGCTG	59	259 pb
7	F- GTGGTGGTAGATTTTCGTTGC R- GAAACACCTATGAAGGAAGC	55	302 pb
8	F- GTAGATGGCCACTAAGCTCC R- CAAAGCTGCACATGATTCCC	55	297 pb
9	F- GTAGTAAGATCCAGCCTACC R- GCACATGACGTAGGTAGTAG	57	345 pb
10	F- CACCTGGAATGGATTTCTTG R- GCATACAGCACGTTCCCTAG	55	321 pb
11a	F- GTTTGACTGACGGAGGCAAG R- GGGTGACAGGTCTGCAATAG	60	432 pb
11b	F- ACAGACGTTAGGCATTTCC R- TGAACAAGACAGAATTAACCG	57	522 pb
11c	F- AAACCACAGCAGGATCGAAG R- TCTAAGCCAGCGCACAATAAAC	56	419 pb

Legenda: F = *forward*, R = *reverse*; TA, temperatura de anelamento.

O Gene *FBLN4* possui 12 exons (Ensembl, número de acesso ENSG00000172638) e foi amplificado pela técnica de PCR com o auxílio dos *primers* descrito por Huchtagowder et al (2006) apresentados na tabela 7, com exceção dos exons 2 e 3 que foram agrupados utilizando o software generunnerTM. Os exons 1 e 12 não são codificantes e não foram avaliados.

Tabela 7: Seqüência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *FBLN4*.

Exon	<i>Primers</i> 5' → 3'	TA (°C)	Produto de PCR
2 e 3	F- TACAGGGAGTTGAGGTGCCG R- GTCCCTTGGAAAGCAGCTATC	56	520 pb
4	F- TTAGCTTGTTGAGCAGAGTGGG R- TTAAGACGCCTGGTGAGAGGA	55	396 pb
5	F- TCAGTGTTGCTGGGGATGTT R- TGAAGCCTGGCTTGAATGG	57	426 pb
6	F- TGGTGAAGCCTTGAGTCCCA R- ATGGAGAACTGTGTGGCAGG	57	552 pb
7	F- TTCTTGACCAGCCCAGGTAGA R- ATGGAGAACTGTGTGGCAGGA	57	284 pb
8	F- TTCTTCCAGTTCTGGGCAGAGA R- TCATCAATGTCTGTGCCAGGG	57	438 pb
9	F- TCTGCCAAGGTACAGGTTGC R- ATTCCCATCATCCCTCAGGG	57	333 pb
10	F- ATCTATTCAGACCAGCGAGTGCC R- TGTGCATGTCAGTTGAGGGTTG	57	401 pb
11	F- TAGCACACAGGCTGACACAA R- TCAGCCACCAGGACTTTCTT	57	320 pb

Legenda: F = *forward*, R = *reverse*; TA, temperatura de anelamento.

As reações de PCR consistiu em 0,5 µg de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer, 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, 500 mM KCl) e 1,5 mM de MgCl₂ em volume final de reação de 40 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 um minuto, temperatura de anelamento (TA) específica para cada par de *primers* por um minuto, e extensão a 72°C por um minuto. Em seguida houve uma etapa de extensão final por cinco minutos a 72°C. A figura 9 representa os ciclos de amplificação utilizados de acordo com a TA de cada primer.

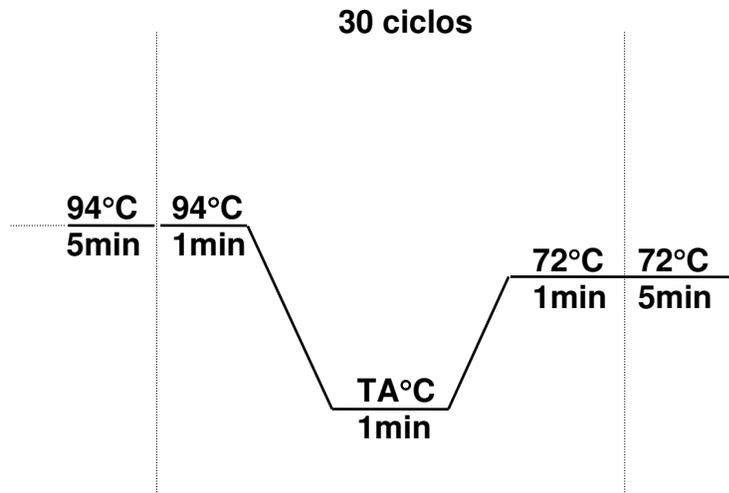


Figura 9: Ciclo de amplificação dos genes candidatos.

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

6. Purificação dos produtos de PCR

As amplificações por PCR que apresentavam fragmentos inespecíficos ou excesso de *primers* foram purificados para um melhor resultado na reação de seqüenciamento. O procedimento consistiu em uma migração dos 40 µl de 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) já contendo brometo de etídio para que a intercalação com o mesmo se dê no ato da eletroforese.

Após a eletroforese, com o auxílio de um transiluminador, cortou-se um cubo do gel que continha a banda desejada e se prosseguiu com a extração usando o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas usando-se o marcador de peso molecular *Low DNA MassTM Ladder* (GIBCO, Carlsbad, Califórnia, USA).

7. Reação de seqüenciamento automático

O seqüenciamento do DNA foi realizado para identificação de mutações nos genes candidatos a partir do produto de PCR. O método utilizado para o seqüenciamento é o de terminação de cadeias (Sanger et al 1977, Prober 1987) que se baseia na incorporação de nucleotídeos terminadores (marcados com fluorescência) da reação em cadeias da polimerase. Estes didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) ou terminadores (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP), uma vez incorporados na fita em síntese, interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos.

As reações de seqüenciamento foram realizadas em volume final de 10 μ l, compostos por 2 μ l de “ABI Prism Terminator Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Mix V. 3.1” (Perkin-Elmer), 5 μ moles do *primer forward* ou *reverse* (os mesmos utilizados para reação de PCR), 40-80 ng do fragmento purificado e H₂O (q.s.p. 10 μ l).

As condições de amplificação utilizadas foram de desnaturação por dois minutos a 96°C, 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 57°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos, e estão esquematizadas abaixo na figura 10.

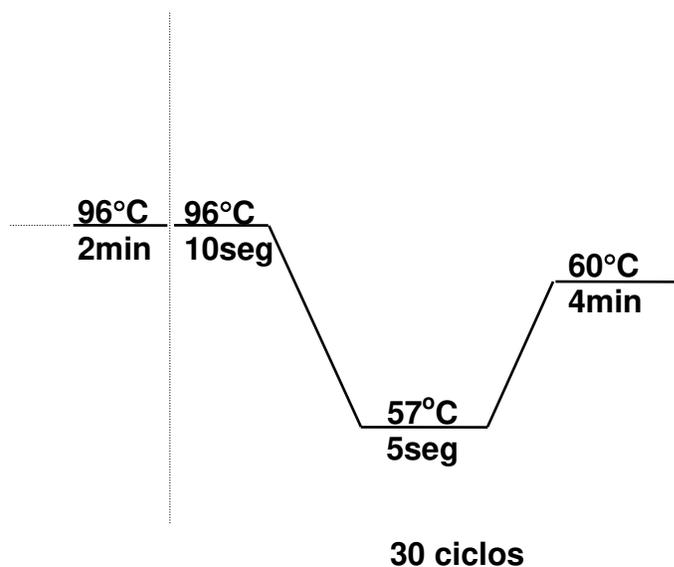


Figura 10: Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento automático.

A seguir, as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol 75%. Acrescentou-se, aos 10 µl da reação, 80 µl de isopropanol 75% em um tubo de 1,5 ml. As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro e centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 150 µl de etanol 70% e centrifugou-se as amostras por 10 minutos a 13000 rpm. Descartou-se todo o etanol e as amostras secaram por quatro horas em local escuro à temperatura ambiente, sendo depois mantidas a -20°C.

Antes da eletroforese, as amostras foram eluídas em um tampão formamida/*Blue Dextran* (5:1) e desnaturadas a 95°C por cinco minutos. O gel de seqüenciamento foi preparado com 4,5% de acrilamida e bis-acrilamida na proporção de 1:19, 10,8 g de uréia, 3,0 ml de tampão TBE 10X e H₂O q.s.p. 30 ml, e posteriormente passado em filtro 0,22 µm (Millipore). Para a polimerização do gel foram adicionados 19,5 µl de TEMED e 192 µl de PSA 10%. As amostras aplicadas foram submetidas a eletroforese por seis horas a 1000V no equipamento *ABI Automated DNA Sequencer 377* (Perkin-Elmer). As seqüências foram obtidas pelo programa "*ABI Prism Sequencing Analysis*", analisadas e comparadas com a seqüência normal do gene com o auxílio do programa *generunner*TM e *chromas*TM.

8. Análise de Restrição

A seguir são descritas as técnicas de análises de restrição para as duas alterações localizadas nos genes *FBLN5* e *FBLN4*, respectivamente, com as enzimas específicas para cada alteração.

Para avaliar se as referidas alterações constituíam um polimorfismo, foi estudado um grupo controle cego formado por 50 indivíduos não aparentados com os pacientes da pesquisa.

8.1. Enzima de restrição *Taq I*

A enzima de restrição *Taq I* foi utilizada para a identificação de uma alteração no exon 9 do gene *FBLN5*, o qual cria um sitio de restrição no fragmento dividindo-o, portanto, em dois outros fragmentos, conforme observado na tabela 8. Essa análise foi utilizada para a identificação dos genitores dos pacientes e de 50 indivíduos controle.

Indivíduos homocigotos TT não devem apresentar alteração no tamanho do fragmento de PCR devendo haver, portanto, após a digestão enzimática, apenas um fragmento com 345pb. Por outro lado, os indivíduos homocigotos para essa alteração apresentam a substituição da base T para C no códon 315 devendo apresentar, portanto, dois fragmentos de tamanho diferentes, com 170pb e 175pb, os quais em gel de agarose 3% são vistos como um único fragmento pelo fato de não ser possível discriminar bandas tão próximas usando essa abordagem. Os heterocigotos apresentam três bandas (345pb, 175pb e 170pb) (figura 11).

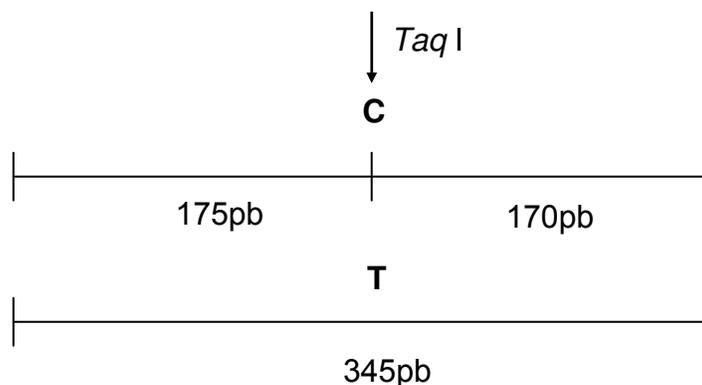


Figura 11: Representação esquemática da análise de restrição da alteração I315I no gene *FBLN5*.

Para tanto, foram digeridos os produtos de PCR com 10 U da enzima de restrição *Taq I* em um volume final de 30 μ l, segundo o protocolo descrito pelo fabricante da enzima. As reações foram incubadas em banho a 65°C por 2 h.

Após a incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em um gel de agarose 3% preparado e migrado em TAE 1X já contendo brometo de etídio, após visualizados sob luz ultravioleta.

8.2. Enzima de restrição *Hinc II*

A enzima de restrição *Hinc II* foi utilizada para a identificação de uma alteração no exon 8 do gene *FBLN4*, para este estudo foi utilizado os *primers* 8F e 9R da tabela 7 gerando um amplificado de 664pb, o qual é cortado em fragmentos conforme demonstrado na tabela 8.

A substituição da base A para G no códon 259 da *FBLN4* resulta na criação de um sítio alternativo de restrição para a enzima *Hinc II*, possibilitando que esta fosse utilizada para a identificação dos genitores dos pacientes e do grupo controle. Assim, a presença da alteração I259V resulta na clivagem do produto de PCR (664pb) em três fragmentos (270, 214 e 180), respectivamente. Por outro lado, na presença da base A, a análise de restrição resulta em dois fragmentos (484pb e 180pb), respectivamente, conforme demonstrado na figura 12.

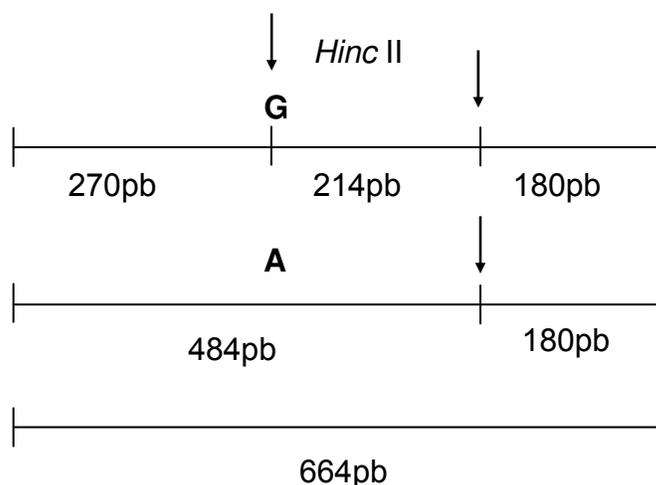


Figura 12: Representação esquemática da análise de restrição da alteração I259V no gene *FBLN4*.

A reação de digestão foi incubada a 37°C durante a noite contendo 10,0µl do produto de PCR, 6,5 µl H₂O, 3,0µl de tampão Tango e 0,5 µl da enzima de restrição *Hinc* II (10 U).

Após a incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X já contendo brometo de etídio, sendo posteriormente visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 8 – Análises de restrição nos genes *FBLN4* e *FBLN5*.

Gene Analisado	Produto de PCR	Enzima	Genótipos	
<i>FBLN5</i>	345 pb	<i>Taq</i> I T/CGA	TT - Um fragmento (345pb)	CC - Dois fragmentos (170pb e 175pb)
<i>FBLN4</i>	664 pb	<i>Hinc</i> II GTY/RAC	AA - Dois fragmentos (484pb e 180pb)	GG - Três fragmentos (270, 214 e 180pb)

9. Duplicação *in Tandem*

Foi descrita por Markova et al (2003) uma duplicação *in tandem* que resulta em um transcrito maior devido a uma duplicação interna de 483 nucleotídeos, resultando na síntese e secreção da proteína fibulina 5 mutante. Essa mutação representa a duplicação de 22 Kb no gene envolvendo a seqüência desde o intron 4 até o exon 9. Os autores sugeriram que essa duplicação poderia estar envolvida com o fenótipo de cutis laxa autossômica dominante.

Para analisar a presença dessa duplicação no gene *FBLN5*, foi utilizado o primer 9F da tabela 6 e o T-Fbln5-4R 5` TGTAATAACCTCATCAGTTGTC 3`, os quais intercalam em regiões próximas ao ponto de quebra da duplicação originando um amplificado de 350pb. Para maior confiabilidade ao teste e também para assegurar que não haveria falha na reação de PCR, foi usado junto à reação um par de *primers* como controle interno. Este controle interno foi feito com o exon 5 do mesmo gene que amplifica um fragmento de 229 pb. Estes foram submetidos à reação de PCR previamente descrita pelo autor, com TA variando 1°C entre 50°C e 62°C.



RESULTADOS

1. Gene *LOX*

A figura 13 ilustra a amplificação dos produtos de PCR do gene *LOX* do indivíduo 3 em eletroforese em gel de agarose 1,0%, mostrando o tamanho dos fragmentos conforme descritos na tabela 5.

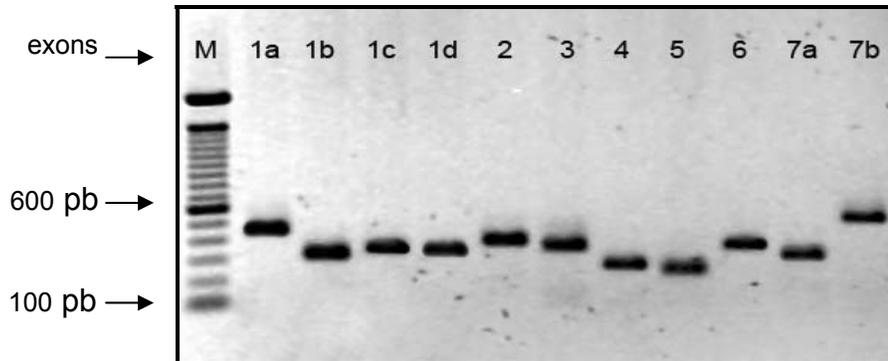


Figura 13: Fotografia do gel de agarose 1,0% no qual foram testadas as amostras de PCR do gene *LOX* do indivíduo 3. M - marcador de peso molecular de 100pb.

Todos os exons amplificados do gene *LOX* foram seqüenciados nos três indivíduos e em quatro dos genitores. Com o auxílio do software generunner™, o gene foi analisado após amplificação com 11 pares de *primers*, sendo que nenhuma mutação foi encontrada.

2. Gene *FBLN5*

A figura 14 ilustra o resultado da amplificação dos produtos de PCR do indivíduo 3 contendo regiões codificantes do gene *FLNB5* em eletroforese demonstrando o tamanho dos fragmentos, conforme descritos na tabela nº 6.

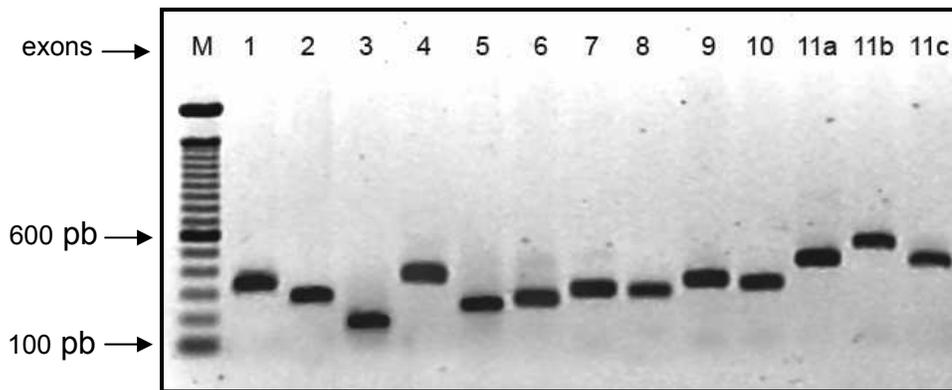


Figura 14: Produto de amplificação do gene *FBLN5* em eletroforese de gel de agarose 1% no indivíduo 3 com CLAR tipo II. M - marcador de peso molecular de 100pb.

Foi seqüenciada toda a região codificante do gene *FLBN5* e não foi identificada nenhuma mutação que altere a seqüência de aminoácido. Foi encontrada, entretanto, uma troca de base 945 T>C (I315I) no exon 9 nos indivíduos 1 e 2, em homozigose em ambos (figura 15). Como descrito acima, tal substituição conserva o aminoácido, tratando-se de uma mutação silenciosa. Na presente amostra, o indivíduos 3 apresentou-se homozigoto TT.

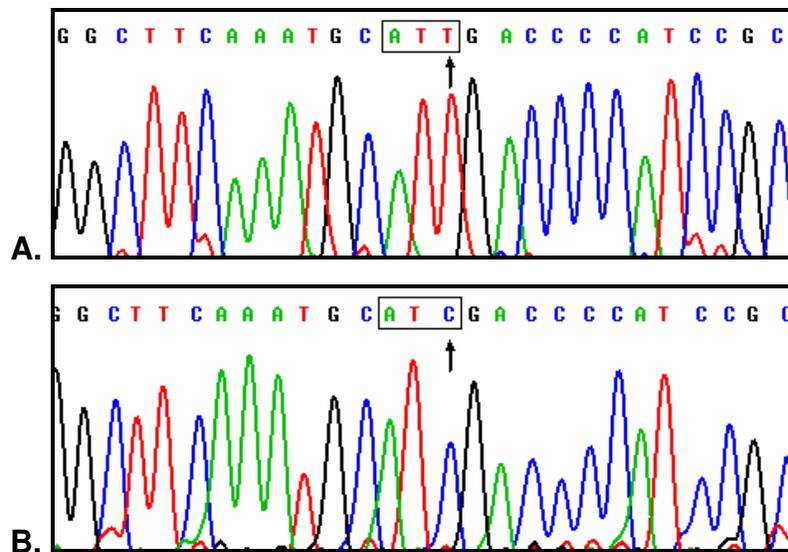


Figura 15: Eletroferograma mostrando mutação silenciosa I315I. A- homozigoto TT; B- homozigoto CC.

A mãe do indivíduo 1 apresentou-se homocigota CC, entretanto não foi possível avaliar o genótipo paterno. O mesmo foi válido para o paciente 3, sendo a sua mãe heterocigota. Com relação ao indivíduo 2, o pai é heterocigoto e a mãe é homocigota CC. O grupo controle apresentou 18 indivíduos homocigotos CC, 23 heterocigotos e nove homocigotos TT (figura 16).

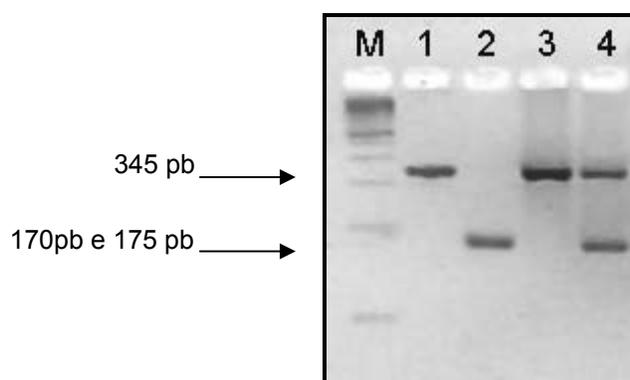


Figura 16: Análise de restrição para alteração I315I com enzima *Taq I* no gene *FBLN5*. M - marcador de peso molecular de 100pb, 1- PCR controle, 2- homocigoto CC, 3- homocigoto TT, 4- heterocigoto.

3. Gene *FBLN4*

A figura 17 ilustra o resultado do PCR do gene *FLNB4* no indivíduo 3 em eletroforese em gel de agarose 1,0% , conforme a tabela 7.

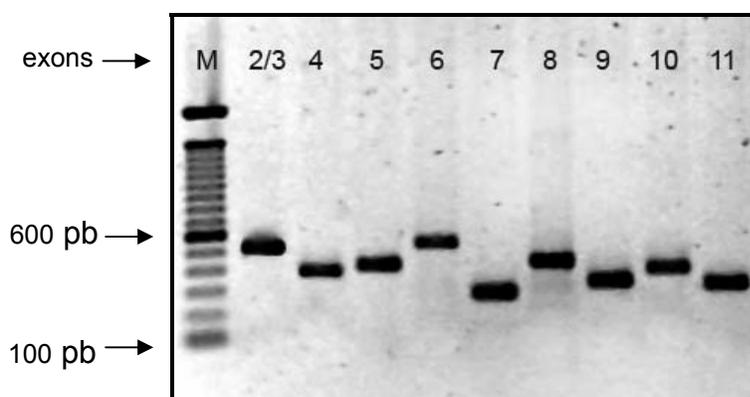


Figura 17: Produto de amplificação do gene *FBLN4* do indivíduo 3 em eletroforese de gel de agarose 1,0%. M- marcador de peso molecular de 100pb.

Todos os exons codificantes do gene *FBLN4* foram seqüenciados nos três indivíduos e nos genitores participantes do estudo. Foi identificada uma alteração pontual no exon 8 em homozigose nos indivíduos 2 e 3, estando a mesma em heterozigose no indivíduo 1. Essa alteração consiste numa substituição do primeiro nucleotídeo do códon 259 (776A→G), modificando a trinca ATC, que corresponde ao aminoácido isoleucina pela trinca GTC, correspondente ao aminoácido valina (figura 18).

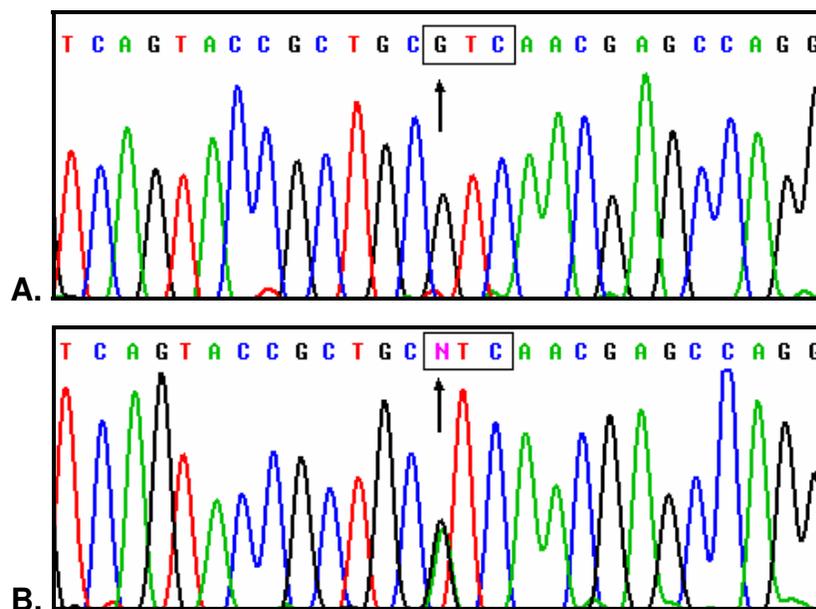


Figura 18: A- Eletroferograma demonstrando alteração I259V em homozigose no gene *FBLN4*; B- heterozigoto. Dentro do retângulo está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 259.

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

No estudo de 50 voluntários não aparentados e não relacionados à doença, foram identificados 49 indivíduos homocigotos GG e um indivíduo homocigoto AA. Os genótipos paternos dos indivíduos 1 e 3 não foram analisados. O pai e mãe do indivíduo 2 apresentaram homocigose GG, o que ocorreu também para a mãe do indivíduo 3. A mãe do indivíduo 1 apresentou heterocigose (Figura 19).

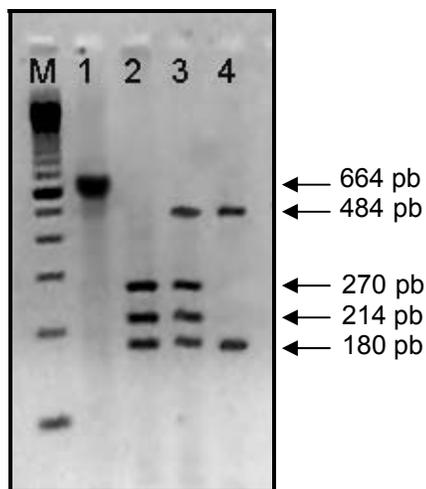


Figura 19: Análise de restrição para a mutação I259V no gene *FBLN4* com a enzima *Hinc* II. M- marcador de peso molecular de 100pb, 1- PCR controle, 2- homocigoto GG, 3- heterocigoto e 4- homocigoto AA.

No indivíduo 2 foi identificada uma alteração CAC>CAT em homocigose no códon 92, porém essa variante não altera a seqüência de aminoácido, conservando o aminoácido histidina. A mesma é encontrada em heterocigose no indivíduo 1 e não foi observada no paciente 3 (figura 20). As mães dos indivíduos 1 e 3 apresentaram-se homocigotas CC, entretanto não foi possível avaliar o genótipo paterno. Com relação ao indivíduo 2, pai e mãe são homocigotos TT.

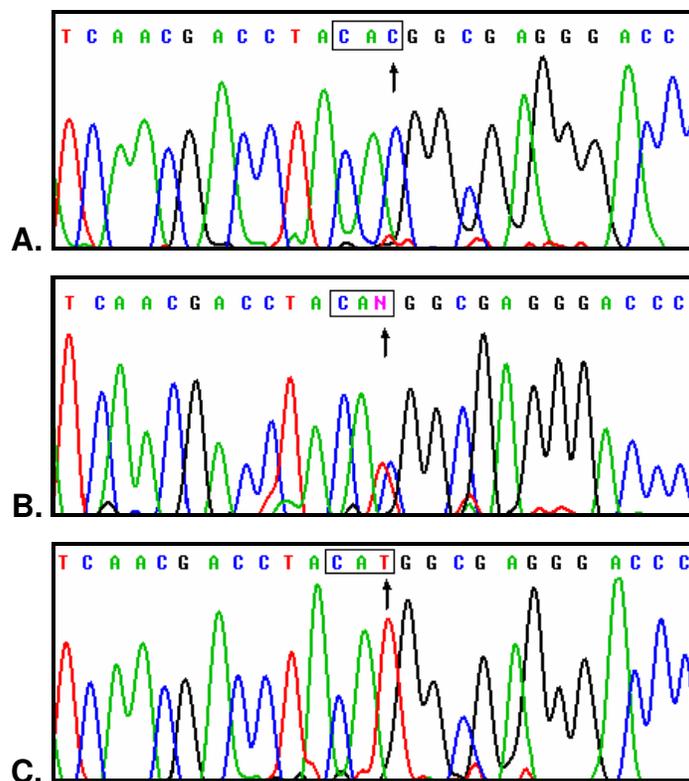


Figura 20: Eletroferograma mostrando a alteração do aminoácido H92H do gene *FBLN4*. A. homocigoto CC, B. seqüência heterocigota, C. homocigoto TT.

A alteração intrônica IVS5+23 G>C foi observada em heterocigose no indivíduo 1 e em homocigose nos indivíduos 2 e 3 (figura 21). Esta alteração foi previamente relatada no banco de dados de polimorfismos (SNP, rs630394).

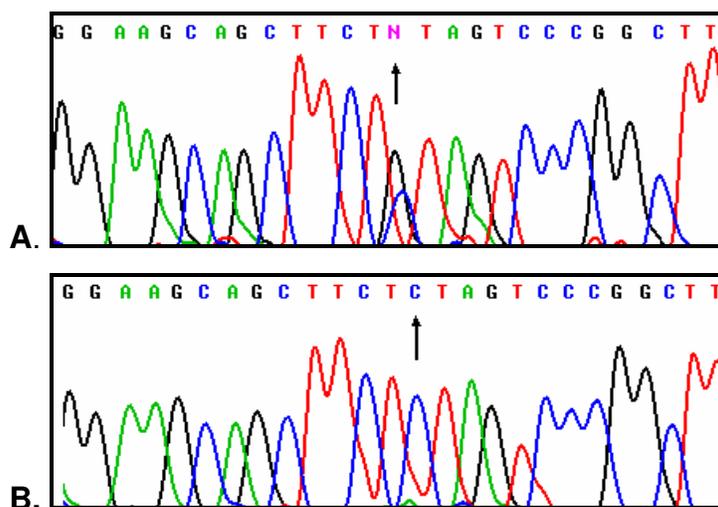


Figura 21: Eletroferograma mostrando a alteração IVS5+23 G>C do gene *FBLN4*. A. seqüência heterocigota, B. homocigoto CC.

A alteração IVS7+55 T>C no intron 7 foi observada no indivíduo 1 em heterozigose, no indivíduo 2 em homozigose CC e no indivíduo 3 em homozigose TT (SNP, rs501630) (figura 22).

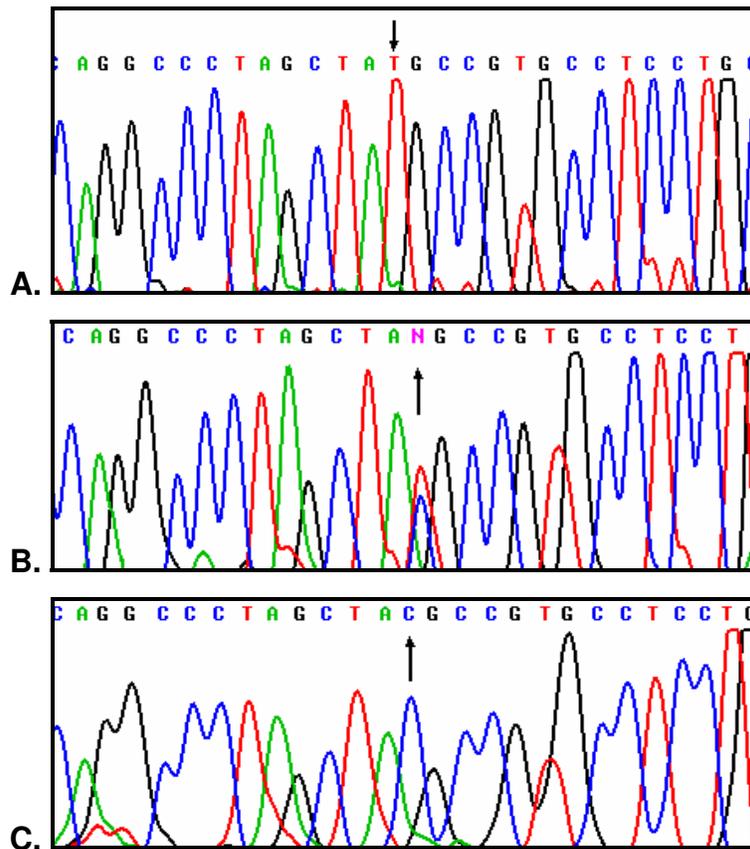


Figura 22: Eletroferograma mostrando a alteração IVS7+55 T>C do gene *FBLN4*. A. homozigoto TT, B. seqüência heterozigota, C. homozigoto CC.

No intron 9 foi encontrada a alteração IVS10-33 C>T, sendo o indivíduo 1 heterozigoto, o indivíduo 2 homozigoto TT e o indivíduo 3 homozigoto CC (SNP, rs594689) (figura 23).

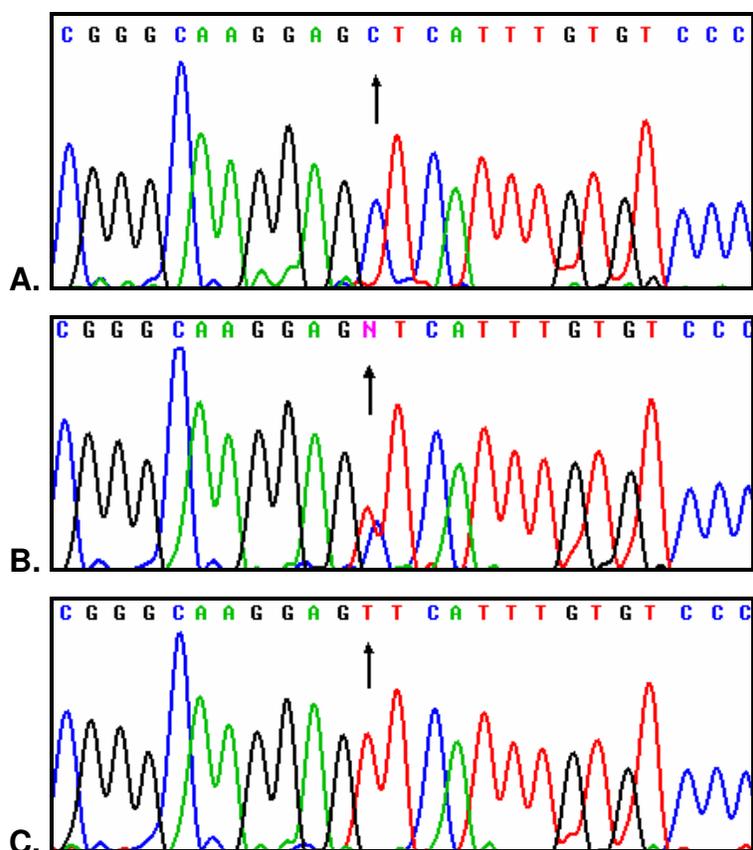


Figura 23: Eletroferograma mostrando a alteração IVS10-33 C>T do gene *FBLN4*. A. homocigoto CC, B. seqüência heterocigota, C. homocigoto TT.

Em resumo, os resultados obtidos dos genes *FBLN4* e *FBLN5* das três famílias estudadas são demonstrados na tabela 9.

Tabela 9 – Resumo das alterações encontradas nos genes *FBLN4* e *FBLN5*.

Genes	Alteração	Bases	Família 1		Família 2			Família 3	
			Ind. 1	Mãe	Ind. 2	Mãe	Pai	Ind. 3	Mãe
<i>FBLN5</i>	I315I	T→C	CC	CC	CC	CC	CT	TT	CT
<i>FBLN4</i>	I259V	A→G	AG	AG	GG	GG	GG	GG	GG
<i>FBLN4</i>	H92H	C→T	CT	CC	TT	TT	TT	CC	CC
<i>FBLN4</i>	IVS5+23	G→C	GC	-	CC	-	-	CC	-
<i>FBLN4</i>	IVS7+55	T→C	TC	-	CC	-	-	TT	-
<i>FBLN4</i>	IVS10-33	C→T	CT	-	TT	-	-	CC	-

Legenda: Ind. , indivíduo; -, não avaliado.

4. Duplicação *in Tandem*

Todos os sujeitos foram analisados quanto à presença da duplicação *in tandem* no gene *FBLN5*, como descrito por Markova et al (2003), e nenhum caso foi positivo para esta alteração. Portanto, em todas as amostras ocorreu apenas a amplificação do fragmento controle de 229 pb. A ausência dessa duplicação nos indivíduos estudados era esperada, sendo que esta alteração foi observada apenas em pacientes com fenótipo de cutis laxa com padrão de herança autossômico dominante.

A figura nº 24 mostra a amplificação da duplicação *in tandem* do indivíduo 3 junto com o controle interno da reação.

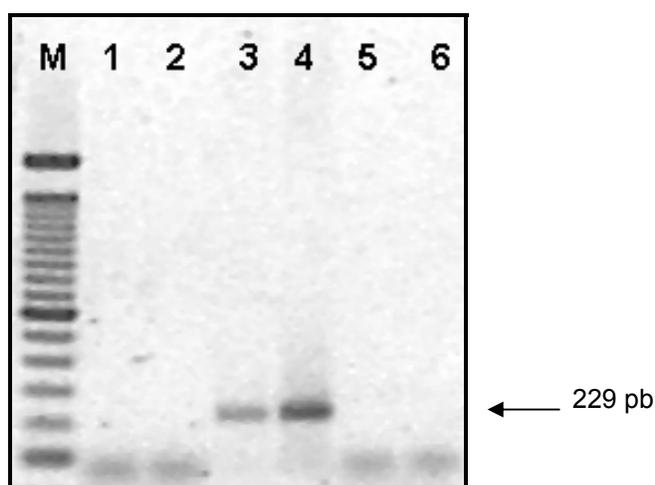


Figura 24: Fotografia do gel de agarose 1% no qual foram testadas as amostras da duplicação *in tandem*. M- marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen), 1- PCR com TA 51°C, 2- TA 53°C, 3- TA 55°C, 4- TA 57°C, 5- TA 59°C, 6- TA 61°C.



DISCUSSÃO

Cutis laxa é o nome dado a um grupo de condições congênitas com defeitos estruturais importantes no sistema das fibras elásticas. O trabalho de Loeys et al (2002), em uma família com CLAR tipo I, mostrou que mutação missense S227P no gene da fibulina 5 causou formação anormal de fibras elásticas nos indivíduos homocigotos afetados para essa condição. Seus achados foram corroborados por estudos em animais que confirmam a importância do gene *FBLN5* na formação dessas fibras (Nakamura 2002, Yanagisawa 2002). Markova et al (2003) relataram uma duplicação *in tandem* que originou um transcrito maior devido a uma duplicação interna de 483 nucleotídeos, resultando na síntese e secreção da proteína fibulina 5 mutante, envolvido com o fenótipo de cutis laxa autossômica dominante. Ainda na família das fibulinas, Huchtagowder et al (2006) identificaram uma mutação missense E57K no gene da fibulina 4 a partir de um paciente com CLAR tipo I. Estes estudos sugerem que ambas as fibulinas, 4 e 5, tenham papéis importantes na elastogênese. Os três sujeitos analisados neste trabalho apresentam redução da quantidade, encurtamento e fragmentação das fibras elásticas.

Realizou-se, portanto, o seqüenciamento de toda região codificante dos genes *FBLN5* e *FBLN4*. Apesar de mutações nos genes *FBLN5* terem sido previamente associados a CLAR tipo I, essas não foram observadas em sujeitos com o tipo II, sendo apenas encontrado um polimorfismo no exon nove (13151, SNP rs2430347) freqüente na população controle. Também não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado às bases de dados de SNPs. Essa mesma alteração havia sido descrita por Wopereis et al (2005) em heterozigose em três pacientes com CLAR, não sendo associado à doença. Este mesmo grupo havia descrito, um ano antes, cinco indivíduos com quadro clínico compatível com CLAR tipo I e, dentre estes, estudou três para mutações no gene da fibulina 5, não encontrando nenhuma alteração gênica que justificasse o fenótipo (Morava et al 2004).

Ainda em relação à fibulina 5, foi também considerada a duplicação *in tandem* descrita por Markova et al (2003). A abordagem utilizada para o estudo dessa duplicação foi diferente da utilizada pelo referido autor, pois foi utilizado

DNA genômico. Os pacientes foram analisados quanto à presença desta duplicação e nenhum caso positivo para esta alteração foi observado. A ausência dessa duplicação nos pacientes estudados era esperada, pois esta alteração foi descrita apenas em um paciente heterozigoto com fenótipo de cutis laxa com padrão de herança autossômico dominante.

Também no presente estudo, a análise do seqüenciamento do gene *FBLN4* identificou a alteração I259V (776A→G). Embora mude a seqüência aminoácidos, essa alteração foi também pesquisada em 50 indivíduos controle e não aparentados com os sujeitos da pesquisa, sendo observado 98% de alelos G, sendo, portanto, alta sua freqüência e considerada polimórfica (SNP, rs601314). A freqüência deste SNP é similar à encontrada em populações asiáticas e européias e apresenta algumas diferenças em relação a populações africanas, de acordo com o projeto HapMap. Ainda no gene *FBLN4*, outro SNP foi observado, a alteração no códon 92 (SNP, rs633800) a qual não altera a seqüência de aminoácidos, assim como as mutações intrônicas IVS5+23 G>C, IVS7+55 T>C, IVS10-33 C>T.

Deste modo, todos os SNPs encontrados no presente estudo não são responsáveis pelo fenótipo dos pacientes, tendo sido observados em freqüências alélicas semelhantes em diversas populações estudadas na literatura.

Finalmente, o gene *LOX*, que codifica a enzima lisil oxidase e que se apresentou deficiente em dois sujeitos com o quadro clínico compatível com CLAR tipo II no estudo de Khakoo et al (1997), não havia sido investigado nesse grupo de doenças, tornando assim importante a sua avaliação. Além disso, trata-se do primeiro trabalho no Brasil a estudar esses genes em pacientes com CLAR tipo II. Não foram, entretanto, detectadas mutações deletérias nesse gene que justificassem as características dos pacientes.



CONCLUSÃO

A despeito de mutações nos genes *FBLN4* e *FBLN5* terem sido previamente associados à CLAR tipo I, os mesmos não evidenciaram alterações significativas no tipo II. O gene *LOX*, que não havia sido estudado nesse grupo de doenças, também foi excluído nessas famílias.

O polimorfismo I259V (776A→G) tem frequência similar à encontrada em populações asiáticas e européias, não podendo ser considerada causa da doença.

As bases moleculares para a CLAR tipo II, SPE ou GO continuam indeterminadas. Novos estudos envolvendo outros genes candidatos com esta ou outra abordagem laboratorial são necessários para elucidar definitivamente as dúvidas quanto à classificação nosológica desse grupo de doenças e suas bases biológicas.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

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.

Al-Gazali LI, Sztriha L, Skaff F, Haas D. Gerodermia Osteodysplastica and Wrinkly Skin Syndrome: are they the same? *Am J Med Genet* 2001; 101(3):213-20.

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.

Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep* 2003; 4(12):1127-31.

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.

Bamatter F, Franceschetti A, Klein D, Sierro A. Gérdermie ostéodyplastique héréditaire. Un nouveau biotype de la "progeria". *Ann Pediat* 1950; 174:126-7.

Beighton PH. The dominant and recessive forms of cutis laxa. *J Med Genet* 1972; 9(2):216-21.

Boente MC, Asial RA, Winik BC. Geroderma osteodysplastica. Report of a new family. *Pediatric Dermatology* 2006; 23(5):467-72.

Boente MC, Winik BC, Asial RA. Wrinkly skin syndrome: ultrastructural alterations of the elastic fibers. *Pediatric Dermatology* 1999; 16(2):113-7.

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.

Byers PH. Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7 ed, New York: McGraw-Hill, 1995.

Casamassima AC, Wesson SK, Conlon CJ, Weiss FH. Wrinkly skin syndrome: Phenotype and additional manifestations. *Am J Med Genet* 1987; 27(4):885-93.

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.

Debré R, Marie J, Seringe P. "Cutis laxa" avec dystrophies osseuses. *Bull Med Soc Med Hop Paris* 1937; 53:1038-1039.

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.

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.

Ensembl Genome Browser. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000140092. Acesso em Abril/2006.

Ensembl Genome Browser. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000113083. Acesso em Abril/2006.

Ensembl Genome Browser. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000172638. Acesso em Abril/2006.

Fitzsimmons JS, Fitzsimmons EM, Guibert PR, Zaldua V, Dodd KL. Variable clinical presentation of cutis laxa. *Clin Genet* 1985; 28(4):284-95.

Gallagher WM, Greene LM, Ryan MP, Sierra V, Berger A, Laurent-Puig P, Conseiller E. Human fibulin-4: analysis of its biosynthetic processing and mRNA expression in normal and tumour tissues. *FEBS Lett* 2001; 489: 59-66.

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.

Giltay R, Timpl R, Kostka G. Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol* 1999; 18(5): 469-80.

Goldblatt J, Wallis C, Viljoen D, Beighton P. Cutis laxa retarded development and joint hyper mobility syndrome. *Dysmorph Clin Genet* 1988; 1:142-4.

Gorlin RJ, Cohen Jr. MM, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck*. 4^a ed. New York: Oxford University Press; 2001.

Gupta N, Phadk SR. Cutis laxa type II and wrinkly skin syndrome: distinct phenotypes. *Pediatric Dermatol* 2006; 23(3):225-30.

Hamalainen ER, Kemppainen R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics* 1993; 17(3):544-8.

Hofer A, Özkan S, Hermans M, Kubassek N, Sitzler M, Burtscher J, Knopp U, Schoch B, Wanke I, Huebner F, Raabe A, Steinmetz H, Auburger G. Mutations in the lysyl oxidase gene not associated with intracranial aneurysm in Central European families. *Cerebrovasc Dis* 2004; 18(3):189-93.

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.

Hunter AGW. Is gerodermia osteodysplastica underdiagnosed? *J Med Genet* 1989; 25:854-57.

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.

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.

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.

Koch S, Williams M. Acquired Cutis Laxa: case report and review of disorders of elastolysis. *Pediatr Dermatol* 1985; 2(4):282-8.

Kreuz FR, Wittwer BH. Del[2q] – cause of the wrinkly skin syndrome? *Clin Genet* 1993; 43(3):132-8.

Lisker R, Hernandez A, Martinez-Lavin M, Muchinick O, Armas C, Reyes P, Robles-Gil J. Geroderma osteodysplastica hereditaria: Report of three affected brothers and literature review. *Am J Med Genet* 1979; 3(4):389-95.

Loeys B, van Maldergem L, Mortier G, Couke P, Gerniers S, Naeyaert J-M, de Paepe A. 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.

Marchase P, Holbrook K, Pinnell SR. A familial cutis laxa syndrome with ultrastructural abnormalities of collagen and elastin. *J Invest Derm* 1980; 75(5):399-403.

Mariani TJ, Trackman PC, Kagan HM, Eddy RL, Shows TB, Boyd CD, Deak SB. The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5 (extensive sequence homology with the murine RAS recision gene). *Matrix* 1992; 12(3):242-8.

Markova D, Zou Y, Ringpfeil F, Sasaki T, Kostka G, Timpl R, Uitto J, Lu M-L. Genetic heterogeneity in cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (FBLN5) gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72(4): 998-1004.

Morava E, Wopereis S, Coucke P, Gillessen-Kaesbach G, Voit T, Smeitink J, Wevers R, Grunewald S. Defective protein glycosylation in patients with cutis laxa syndrome. *Europ J Hum Genet* 2004; 13(4): 414-21.

Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, Yabe D, Taniwaki M, Furukawa Y, Kobuke K, Tashiro K, Lu Z, Andon NL, Schaub R, Matsumori A, Sasayama S, Chien KR, Honjo T. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *J Biol Chem* 1999; 274:22476-83.

Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J Jr, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis *in vivo*. *Nature* 2002; 415(6868):171-5.

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.

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.

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.

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.

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. A system for rapid DNA sequencing with

fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 1987; 238(4825): 336-41.

Reed W, Horowitz R, Beighton P. Acquired Cutis Laxa. *Arch Dermatol* 1971; 103(6):661-9.

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.

Roszbach MJ. Ein merkwürdiger Fall von greisenhafter Veränderung der allgemeinen Körperdecke bei einem achtzehnjährigen Jungling. *Dtsch Arch Klin Med* 1884; 36:197-203.

Sakati NO, Nyhan WL, Shear CS, Kattan H, Akhtar M, Bay C, Jones KL, Schackner L. Syndrome of cutis laxa, ligamentous laxity, and delayed development. *Pediatrics* 1983; 72:850-6.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci* 1977; 74(12):5463-7.

SNP - NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>. Acesso em Abril/2006.

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.

Svinarich DM, Twomey TA, Macauley SP, Krebs CJ, Yang TP, Krawetz SA. Characterization of the human lysyl oxidase gene locus. *J Biol Chem* 1992; 267(20):14382-7.

Szauter KM, Cao T, Boyd CD, Csiszar K. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol Biol* 2005; 53(7):448-56.

Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft GS, Kielty C, Wilmot C, Donnai D, Read AP, Jones CJP. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibers in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum Molec Genet* 1998; 7(6):1021-8.

Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(6):479–89.

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.

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.

Wopereis S, Morava E, Grünewald S, Mills PB, Winchester BG, Clayton P, Coucke P, Huijben KMLC, Wevers RA. A combined defect in the biosynthesis of N- and O-glycans in patients with cutis laxa and neurological involvement: the biochemical characteristics. *Biochimical et Biophysical Acta* 2005; 1741(1-2):156-64.

Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development *in vivo*. *Nature* 2002; 415(6868):168-71.

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.

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.



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, 24/10/06.
(PARECER PROJETO: 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 Emenda que inclui os testes ao gene *FBLN4*, 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.

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de outubro de 2006.


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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

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