

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DO GENE LORICRINA PARA AVALIAÇÃO DA
SUSPEITA DE QUERATODERMIA LORICRINA EM
INDIVÍDUOS DE UMA FAMÍLIA DE MINAS GERAIS**

ORIENTADO: Bruno Diniz Sander Morais

ORIENTADOR: Prof.^a Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

BELO HORIZONTE

Março - 2012

BRUNO DINIZ SANDER MORAIS

**ANÁLISE DO GENE LORICRINA PARA AVALIAÇÃO DA
SUSPEITA DE QUERATODERMIA LORICRINA EM
INDIVÍDUOS DE UMA FAMÍLIA DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética pelo Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

BELO HORIZONTE

Março - 2012

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida” - Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, Carlos, e a minha mãe, Mércia, por todo o apoio a mim dedicado ao longo da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Lúcia pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho no Laboratório de Genética Animal e Humana. Vivi uma experiência extremamente enriquecedora, que me proporcionou acima de tudo grande crescimento como pessoa. Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento do projeto e por minha bolsa de estudos. Agradeço à família estudada no trabalho pela contribuição ao progresso científico e ao dermatologista Paulo Benevoluti pela colaboração. Agradeço aos colegas de laboratório atuais e aos egressos e à Vanessa pelo importante auxílio prestado e pela convivência ao longo desses anos. Agradeço aos participantes da banca examinadora, Dr. Alessandro Ferreira e Prof. Karina Borges, por terem aceitado o convite. Agradeço a todas as pessoas de outros laboratórios que me auxiliaram em algum momento durante o desenvolvimento do projeto, principalmente aos colegas do laboratório do Prof. Evanguedes Kalapothakis e da Prof.^a Maria Raquel Santos Carvalho.

Agradeço aos meus pais, minhas irmãs e toda a família por tudo; sem eles eu não chegaria até aqui. Agradeço aos amigos e colegas por todo o apoio e companheirismo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.VIII
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO	12
➤ A EPIDERME E O ENVELOPE CÓRNEO CELULAR.....	12
➤ GENE E PROTEÍNA LORICRINA	13
➤ A QUERATODERMIA LORICRINA.....	15
➤ JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	21
OBJETIVO	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	245
➤ CASUÍSTICA	25
➤ EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
➤ CONFECÇÃO DOS INICIADORES.....	26
➤ AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	28
➤ ANÁLISE PROTÉICA	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	312
➤ ANÁLISE DO CASO	32
➤ SEQUENCIAMENTO	32
➤ AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ALTERADA.....	38
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	439

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Possíveis fenótipos causados pelas mutações descritas no gene loricrina.....Pág. 17
- Figura 2 - Características histopatológicas da epiderme de indivíduos afetados pela QL.....Pág. 18
- Figura 3 - Heredograma da família estudada.....Pág. 31
- Figura 4 - *Primers* utilizados com seus respectivos locais de anelamento e tamanho dos *amplicons* obtidos.....Pág. 26
- Figura 5 - Amplificação e sequenciamento do éxon 1.....Pág. 32
- Figura 6 - Amplificação e sequenciamento do segundo segmento do éxon 2.....Pág. 33
- Figura 7 - Alteração C>T.....Pág. 34
- Figura 8 - Alteração A>C.....Pág. 34
- Figura 9 - Alteração G>A.....Pág. 35
- Figura 10 - Ins TGGCGG.....Pág. 36
- Figura 11 - Ins GGCGGCTCTGGC.....Pág. 36
- Figura 12 - Localização das alterações encontradas.....Pág. 37
- Figura 13 - Alinhamento e comparação entre proteínas selvagem e mutada.....Pág. 38
- Figura 14 - Avaliação quanto à presença de SLN na proteína alterada.....Pág. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CDE - complexo de diferenciação epidérmico

CRM - Conselho Regional de Medicina

DNA - ácido desoxirribonucléico

ECC - envelope córneo celular

EDTA - ácido tetra-acético etilenodiamina

EGF - receptor do fator de crescimento epidérmico

GFP - proteína verde fluorescente

GJB2 - proteína da junção em fenda beta 2

Ins - inserção

kb - quilobase (10^3 pares de base)

kDa - quilodalton (10^3 dalton)

KLICK - keratosis linearis ichthyosis congenita keratoderma

M - molar

mb - megabases (10^6 de pares de base)

mg - miligrama (10^{-3} grama)

mM - milimolar (10^{-3} molar)

ng - nanograma (10^{-9} grama)

nm - nanômetro (10^{-9} metro)

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*

pb - pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase

PM - padrão de peso molecular

pmol - picomol (10^{-12} mol)

POMP - proteína de maturação de proteassomos

PPRP - pequenas proteínas ricas em prolina

QL - queratodermia loricrina

rpm - rotações por minuto

SLN - sequências de localização nuclear

SNP - polimorfismo de único nucleotídeo

SUS - Sistema Único de Saúde

SV - Síndrome de Vohwinkel

TBE - tris/ácido bórico/edta

TGF- α - fator de crescimento transformante alfa

U - unidade

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR 2 - receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

μ L - microlitro (10^{-6} litro)

RESUMO

A epiderme dos mamíferos é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso formado por um processo finamente regulado de diferenciação dos queratinócitos que culmina na formação da epiderme madura. A camada mais externa desse tecido, conhecida como *stratum corneum*, possui importante função de impermeabilização e é constituída por queratinócitos mortos e anucleados chamados de corneócitos. Os corneócitos contêm filamentos de queratina justapostos aos quais se interpõe o envelope córneo celular. Essa estrutura contribui para a função protetora da epiderme e é composta por uma bicamada lipídica externa e uma camada protéica interna, essa última constituída de diversas proteínas, dentre elas a loricrina. A loricrina é uma proteína básica altamente insolúvel e rica em glicina, serina e cisteína. Possui papel estrutural chave para a função do envelope córneo celular, compreendendo de 70% a 85% de sua massa total. O gene codificante dessa proteína está localizado na região 1q21.3 e possui dois éxons, sendo apenas o segundo codificante. Inserções únicas de pares de bases herdadas de maneira dominante já foram descritas nesse éxon e causam diferentes anormalidades na pele. Essas mutações provocam uma substituição na sequência c-terminal da proteína, além de aumentar o tamanho da mesma em 22 resíduos. Não existe correlação genotípico-fenotípica evidenciada. Os fenótipos observáveis são hiperqueratose palmoplantar difusa com *pseudoainhum*, ictiose, eritroqueratodermia e a característica conhecida como “bebê colódio”, que mais tarde evolui para um eritrodermia ictiosiforme. A loricrina mutante se acumula no núcleo e interfere nos processos de multiplicação e apoptose dos queratinócitos. O tratamento é feito com administração de queratolíticos e retinóides e remoção cirúrgica do *pseudoainhum*. No presente estudo, foi realizado sequenciamento dos dois éxons do gene loricrina de indivíduos pertencentes a uma família de Minas Gerais. A família é composta por duas irmãs adolescentes clinicamente suspeitas de possuir a doença e os pais, ambos normais. Há relato de sintomas semelhantes observados no avô paterno falecido. O sequenciamento evidenciou a presença de duas inserções e três alterações pontuais no segundo éxon dos indivíduos afetados. Essas alterações não podem ser consideradas causadoras dos sintomas apresentados. Novas abordagens e outros genes possivelmente relacionados devem ser avaliados para se estabelecer as causas dos fenótipos alterados.

Palavras-chave: Queratodermia, Loricrina, Envelope Córneo Celular.

ABSTRACT

The mammals epidermis is constituted of a stratified epithelium formed by a regulated process of keratinocytes differentiation that results in the formation of the mature epidermis. The outermost layer of this tissue, known as *stratum corneum*, has an important waterproof function and is made up of dead and enucleated keratinocytes named korneocytes. The korneocytes contain juxtaposed keratin filaments, which are linked to the cornified cell envelope. This structure contributes to the protective function of the epidermis and is composed of an external lipid bilayer and an internal protein layer, this one constituted of several kinds of proteins, including loricrin. Loricrin is a basic highly insoluble and glycine-, serine-, cysteine-rich protein. It has a key structure role in cornified cell envelope's function and is responsible for 70% to 85% of its total mass. The gene that encodes this protein is located in 1q21.3 and has two exons. Only the second one is protein coding. Dominant inherited single nucleotide insertions have been reported in the second exon and underlie distinct skin abnormalities, caused by the synthesis of aberrant proteins in which the c-terminal amino acid sequences are replaced by missense amino acids. There isn't a genotype-phenotype correlation in the reported cases. The observable phenotypes are diffuse palmoplantar hyperkeratosis with *pseudoainhum*, ichthyosis, erythrokeratoderma and "collodion babies" that later develop into ichthyosiform erythroderma. Mutant loricrin accumulates in the nucleus and interferes in the mitosis and apoptosis processes in the keratinocytes. The treatment of the disease consists in administration of keratolytics and retinoids and surgical removal of the *pseudoainhum*. In the present study, sequencing of both exons of the loricrin gene was conducted in individuals of a family of Minas Gerais. The family members are two girls, sisters, clinically suspected as having the disease, and their parents, both healthy. The passed paternal grandfather of the girls had similar symptoms. The sequencing showed two insertions and three punctual alterations at the second exon in affected individuals. These alterations can't be considered causative of the symptoms presented. New approaches and other possible related genes must be investigated to establish the causes of the aberrant phenotypes.

Key words: Keratoderma, Loricrin, Cornified Cell Envelope.

INTRODUÇÃO

► A EPIDERME E O ENVELOPE CÓRNEO CELULAR

A epiderme dos mamíferos é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso que se renova constantemente. Os queratinócitos são os principais tipos celulares da epiderme e são responsáveis por gerar uma barreira protetora como consequência de um processo extremamente regulado de diferenciação que culmina na formação da epiderme estratificada madura. A diferenciação ocorre a partir da camada basal da epiderme. Ao longo do processo, as células migram para as camadas superiores, quais sejam: espinhosa, granular e finalmente a camada córnea ou *stratum corneum*, onde os queratinócitos mortos, anucleados e completamente diferenciados, também denominados corneócitos, são liberados no ambiente externo. Cada corneócito é constituído principalmente por filamentos de queratina altamente justapostos e alinhados de maneira paralela à superfície da pele, revestidos por uma robusta camada denominada envelope córneo celular (ECC) (XU *et al.*, 2004; NEMES *et al.*, 1999).

O ECC é uma estrutura especializada que contribui para a função de barreira contra a penetração percutânea de químicos e micróbios na pele exercida, principalmente, pelo *stratum corneum*. O ECC é a estrutura mais insolúvel do epitélio estratificado pavimentoso e é formado abaixo da membrana plasmática, substituindo-a ao longo da diferenciação terminal dos queratinócitos, formando uma barreira protetora contra o ambiente no tecido.

O processo de formação do ECC se inicia nas células granulares mais superficiais. Inicialmente, o envelope é observado como uma banda elétron-densa de aproximadamente 15 nm de espessura. Sua rigidez e espessura aumentam gradativamente até atingir 20 nm nos últimos estágios de diferenciação dos queratinócitos. ECCs são vistos como bandas contínuas que cobrem tanto áreas desmossomais quanto não desmossomais. Possuem vários componentes presentes nos desmossomos, como desmogleína, desmoplaquina e envoplaquina e algumas dessas moléculas se ligam a outros componentes não desmossomais do ECC. Desse modo, é apropriado se referir ao ECC como uma espessa camada na qual os desmossomos estão incorporados (PROKSCH *et al.*, 2008).

ECCs são bastante variáveis quanto à composição molecular, dependendo da localização do epitélio, o que confere diferentes propriedades de resistência mecânica, elasticidade e de impermeabilidade ao tecido. De maneira geral, são compostos de involucrina, cistatina A, loricrina, pequenas proteínas ricas em prolina (PPRP), elafina,

proteínas da família S100, profilagrina, putrescina, spermidina, anexina 1, inibidor do ativador de plasminogênio 2, sciellina e alguns componentes desmossomais. A expressão desses fatores e sua deposição no ECC são temporalmente reguladas. Essas estruturas são interligadas pelas enzimas sulfidril oxidase, que produz pontes dissulfeto entre os componentes e as transglutaminases 1,3 e 5, que catalisam a formação de ligações N ϵ -(γ -glutamyl) isopeptídicas de lisina e ligações N¹, N⁸-bis(γ -glutamyl) de spermidina. A resistência e insolubilidade características do ECC são baseadas na formação de ligações isopeptídicas bastante estáveis, enquanto a falta de uma estrutura protéica organizada contribui para sua elasticidade. Além da presença de uma estrutura protéica, o ECC é também constituído por uma bicamada lipídica de 5 nm composta de Ω -hydroxyacyl-sfingosina que se liga de maneira covalente à superfície externa do envelope protéico, principalmente à involucrina, tendo importância na coesão e na função de proteção do *stratum corneum* (ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 1998b).

► GENE E PROTEÍNA LORICRINA

Loricrina (Latin: 'lorica'- capa ou concha protetora) é uma proteína básica altamente insolúvel rica em glicina (47%), serina (23%) e cisteína (6%) (STEVEN *et al.*, 1994), expressa nas células superficiais da camada granulosa, exclusivamente em epitélios ortoqueratinizados, que estão submetidos a um estresse mecânico considerável, como é o caso da epiderme. Sua produção ocorre nos estádios finais de formação do ECC e a proteína é inicialmente depositada em grânulos de queratohialina juntamente com a profilagrina, migrando posteriormente para a periferia celular. Modelagem computacional prediz que a proteína possui três domínios ricos em glicina-serina-cisteína, os quais são intercalados por pequenas regiões enriquecidas em glutamina, e flanqueadas por sequências abundantes em glutamina e lisina. Essas regiões ricas em glutamina e lisina são altamente conservadas entre diferentes espécies, enquanto os domínios com alta quantidade de glicina, serina e cisteína variam na sua conservação. Os resíduos de glicina estão configurados em repetições peptídicas em tandem inexatas e formam uma conformação protéica única denominada *loop* de glicina. Os resíduos de glicina são espaçados ocasionalmente por longas cadeias de peptídeos aromáticos ou alifáticos, os quais devem se associar por interações hidrofóbicas, determinando a disposição das sequências de glicina em uma configuração Ω -*loop-like* (GEDICKE *et al.*, 2006; CANDI *et al.*, 2005; ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 2000).

A proteína é rapidamente interligada pelas transglutaminases 1 e 5 após sua síntese, sendo alvo também da transglutaminase 3, que promove ligações intramoleculares em sua sequência. Ligações isopeptídicas loricrina-loricrina, que ocorrem através de interações entre resíduos de lisina e glutamina, são as mais comuns observadas no ECC, porém a loricrina também se liga às PPRP, as quais parecem funcionar como proteínas conectoras das moléculas de loricrina. A loricrina parece atuar como uma proteína principal de reforço no envelope córneo em sua face citoplasmática. Compreende de 70% a 85% da massa total de proteínas do envelope córneo, sendo uma proteína estrutural chave para a função do mesmo. A loricrina humana possui peso molecular de 26 kDa e contém 315 aminoácidos (CANDI *et al.*, 1995; CANDI *et al.*, 2005).

O gene codificante da proteína loricrina é um gene de cópia única localizado em um *cluster* gênico que se expande por 1.62 mb no braço longo do cromossomo 1, região 21.3 (1q21.3). A organização em *cluster* dos genes dessa região e sua relação estrutural evolutivamente conservada juntamente com a interdependência funcional das proteínas por eles codificadas permitem a designação da região como sendo um complexo gênico, nesse caso, denominado complexo de diferenciação epidérmico (CDE). O CDE contém três famílias gênicas com aproximadamente cinquenta genes envolvidos especificamente na formação da barreira epidérmica. Eles codificam para proteínas do envelope córneo celular, proteínas associadas a filamentos intermediários como, por exemplo, a profilagrina e proteínas ligantes a cálcio da família S100 (MARENHOLZ *et al.*, 2001; TOULZA *et al.*, 2007).

A estrutura do gene loricrina é bastante semelhante às dos genes involucrina e profilagrina. De maneira interessante, esses três genes são expressos tardiamente durante o processo de diferenciação da epiderme na camada granulosa, e todos codificam para proteínas que possuem uma série de repetições de peptídeos não precisamente conservados ao longo da evolução. Essas estruturas simples sugerem que esses genes surgiram por uma série de duplicações de sequências peptídicas primordiais e que talvez sejam genes modernos que continuam a evoluir (YONEDA *et al.*, 1992).

O gene possui dois éxons, o primeiro contendo 34 pares de bases (pb) e o segundo contendo 1215 pb, sendo intercalados por um íntron de 1192 pb. A sequência codificante está inteiramente presente no éxon 2. O gene possui um dos maiores conteúdos de guanina e citosina (GC) conhecidos dentre os genes humanos (aproximadamente 80%), além de possuir sequências altamente repetitivas de nucleotídeos (GEDICKE *et al.*, 2006; ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 1997; YONEDA *et al.*, 1992).

► A QUERATODERMIA LORICRINA

Várias doenças herdáveis da pele já foram associadas ao CDE, sendo a primeira descrita relacionada a uma mutação no gene loricrina (SOUTH *et al.*, 1999). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo de diferenciação da epiderme nos quais foram encontradas mutações associadas a desordens hereditárias são os genes codificantes para alguns tipos de queratinas, o gene codificante da profilagrina, o da transglutaminase 1, entre outros (AKIYAMA *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2008).

Mutações únicas em heterozigose no gene loricrina, causadoras de distintas anormalidades na pele, foram identificadas em nove famílias até o presente momento. Todas as mutações relatadas até a presente data são inserções únicas de pares de bases: 709 insC, 662 insT, 545 insG e 730 insG, sendo a última a mais evidenciada. Essas mutações levam à síntese de proteínas aberrantes nas quais a sequência de aminoácidos da região c-terminal é alterada (ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 1997; SONG *et al.*, 2008).

A primeira mutação no gene loricrina foi identificada em pacientes diagnosticados como portadores da Síndrome de Vohwinkel (SV). Entretanto, as características clínicas são diferentes da SV original descrita por Vohwinkel na literatura alemã em 1929, a qual hoje se sabe ser causada por mutações no gene GJB2, codificante para a proteína conexina 26. Essa proteína é componente das junções em fenda, estruturas essenciais para a comunicação celular em várias células epiteliais. Fenótipos variáveis podem ser observados na SV original, sendo em parte dependentes do local e tipo da mutação no gene GJB2 (ALI *et al.*, 2006; BONDESON *et al.*, 2006).

Pacientes com mutações no gene loricrina e aqueles que possuem a SV original compartilham algumas características, como hiperqueratose palmoplantar difusa (característica observada em todos os indivíduos portadores de qualquer das mutações causadoras de fenótipos aberrantes relatadas no gene loricrina, sem exceção), podendo apresentar aspecto de “favos de mel” e bandas de constrição digitais, ambas as características presentes na maior parte, porém não em todos os casos (Figura 1A). As bandas de constrição digitais são também conhecidas como *pseudoainhum* e podem levar à auto-amputação devido à restrição da circulação na extremidade dos dedos. Apesar das semelhanças, os sintomas se diferem em alguns aspectos. Pacientes com SV original mostram uma peculiar hiperqueratose em forma de “estrela-do-mar” ou linear sobre as juntas nas extremidades além de redução da capacidade auditiva para sons agudos. Em contraste, pacientes com mutações no gene loricrina não possuem esse tipo de

hiperqueratose ou problemas de audição, mas mostram diferentes lesões na pele em áreas distintas da palmar ou plantar. Essas lesões podem ser descritas como ictiose não eritodérmica generalizada (Figura 1B) e os indivíduos são designados como tendo uma variante ictiosica da SV. Em outros casos, placas hiperqueratóticas eritematosas bem demarcadas e generalizadas (Figura 1C) são notadas e clinicamente diagnosticadas como uma forma de eritroqueratodermia. Em um terceiro fenótipo associado observável, bebês nascem como “bebês colódio” (Figura 1D) e mais tarde evoluem a uma eritrodermia ictiosiforme (Figura 1E) e são designados clinicamente como tendo uma forma de eritrodermia ictiosiforme congênita não bolhosa. Os infantes nascem cobertos por membrana tipo filme, brilhante, marrom-amarelada, que lembra colódio, frequentemente resultando em ectrópio e eversão dos lábios. Dentro de horas esta membrana seca, racha, e descasca dentro de um ou dois dias, mas pode formar-se novamente várias vezes. O bebê colódio é de risco por causa do aumento insensível da perda de água através da pele, que pode resultar em falência renal aguda e/ou dano cerebral permanente se não houver reposição de fluido. Infecções pulmonares e septicemia também podem ocorrer. Ictioses formam um grupo clinicamente e etiologicamente heterogêneo de desordens do processo de cornificação e são caracterizadas por uma escamação generalizada da pele. A ictiose, apresentando-se na forma não eritodérmica generalizada ou na forma de eritrodermia ictiosiforme é a única característica, em associação com a hiperqueratose palmoplantar difusa, observada em todos os casos relatados até a presente data (ISHIDA-YAMAMOTO, 2003; OJI *et al.*, 2006).

Para evitar confusões com a SV original causada por mutações no gene da conexina 26, o termo “Queratodermia Loricrina” (QL) foi proposto (ISHIDA-YAMAMOTO, 2003). Não existe, ainda, nenhuma correlação genotípico-fenotípica notada nos indivíduos afetados. Existem variações de severidade em pacientes afetados até mesmo dentro da mesma família. A razão para isso ocorrer ainda não é clara. Talvez esteja relacionada com diferenças na expressão ou polimorfismo no gene loricrina, além da interação com outros genes.

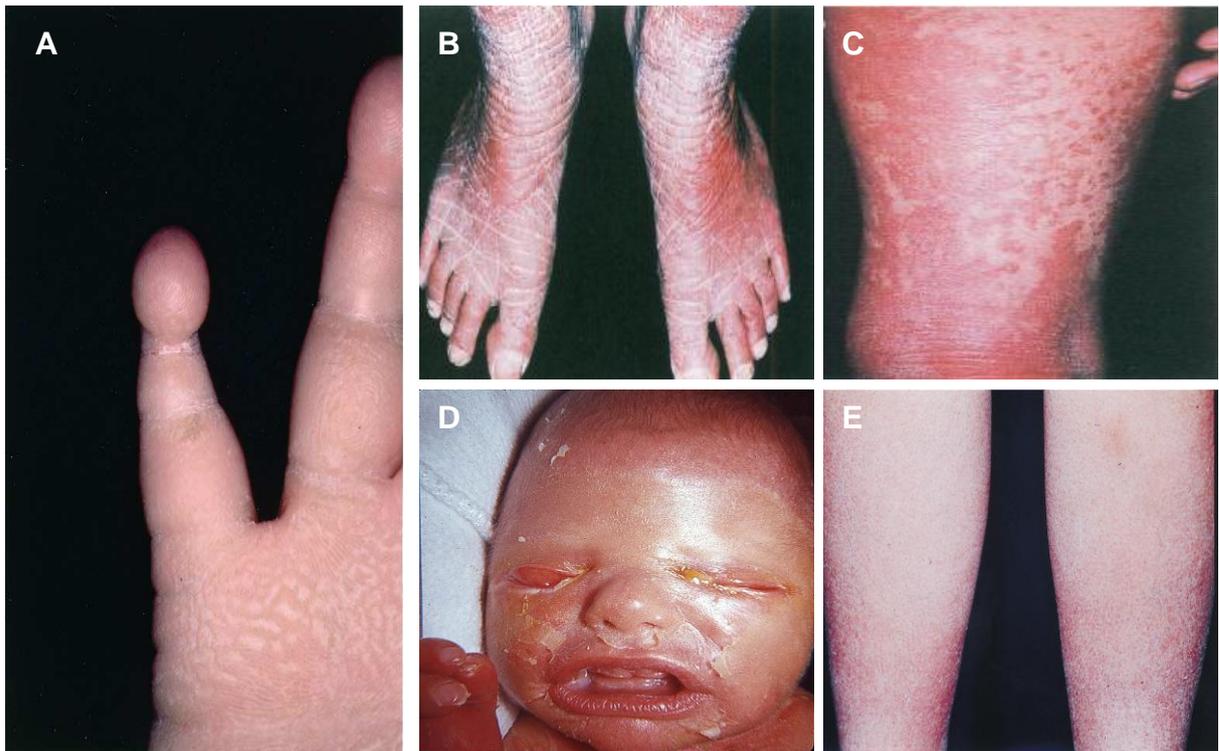


Figura 1 - Possíveis fenótipos causados pelas mutações descritas no gene loricrina. Hiperqueratose palmoplantar difusa com aspecto de “favos de mel” e bandas de constrição digitais (A); Ictiose não eritodérmica generalizada (B); Eritroqueratodermia (C); Bebê colódio (D) e eritrodermia ictiosiforme (E). (ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 1997; ISHIDA-AMYAMOTO *et al.*, 2002)

Apesar de algumas variações existirem entre esses pacientes, quase todas as características microscópicas, ultra-estruturais e imunohistológicas são compartilhadas. A camada córnea da epiderme é bastante espessa e retém núcleos arredondados que normalmente não estão presentes nessa camada (Figura 2A e 2B). A camada granulosa é também espessa e os núcleos possuem deposições granulares elétron-densas características (Figura 2A e 2D). Esses depósitos e restos nucleares no *stratum corneum* são compostos de loricrina mutante (Figura 2C e 2D).

A pele apresenta um acentuado aumento na perda de água, resposta de reparo acelerada após perturbações agudas, hidratação e coesão reduzidas além de aumento da fragilidade, apesar dos indivíduos afetados não terem relatado maior susceptibilidade à injúria nas regiões afetadas, possivelmente devido a um aumento na expressão de outras proteínas constituintes do ECC que compensariam o aumento da fragilidade dos corneócitos. Os motivos pelos quais ocorre uma anormal fragilidade nas camadas nucleadas mais externas permanecem desconhecidos. A alteração provocada no arcabouço protéico do ECC leva a anormalidades no processo de deposição da bicamada lipídica externa, que se mostra configurada de maneira irregular, frouxamente organizada e/ou fragmentada e espaçada por camadas incompletamente processadas, características que constituem fator

determinante para o elevado nível de desidratação observado. A acelerada cinética de reparo é explicada por uma hiperatividade secretora dos corpos lamelares após perturbações no tecido. Essas estruturas, originárias do aparelho de Golgi, contêm os lípidos constituintes da bicamada lipídica externa e, dessa forma, restauram-na rapidamente, ainda que de maneira anormal. Esse aumento possivelmente ocorre como uma resposta compensatória às anormalidades evidenciadas (SCHMUTH *et al.*, 2004).

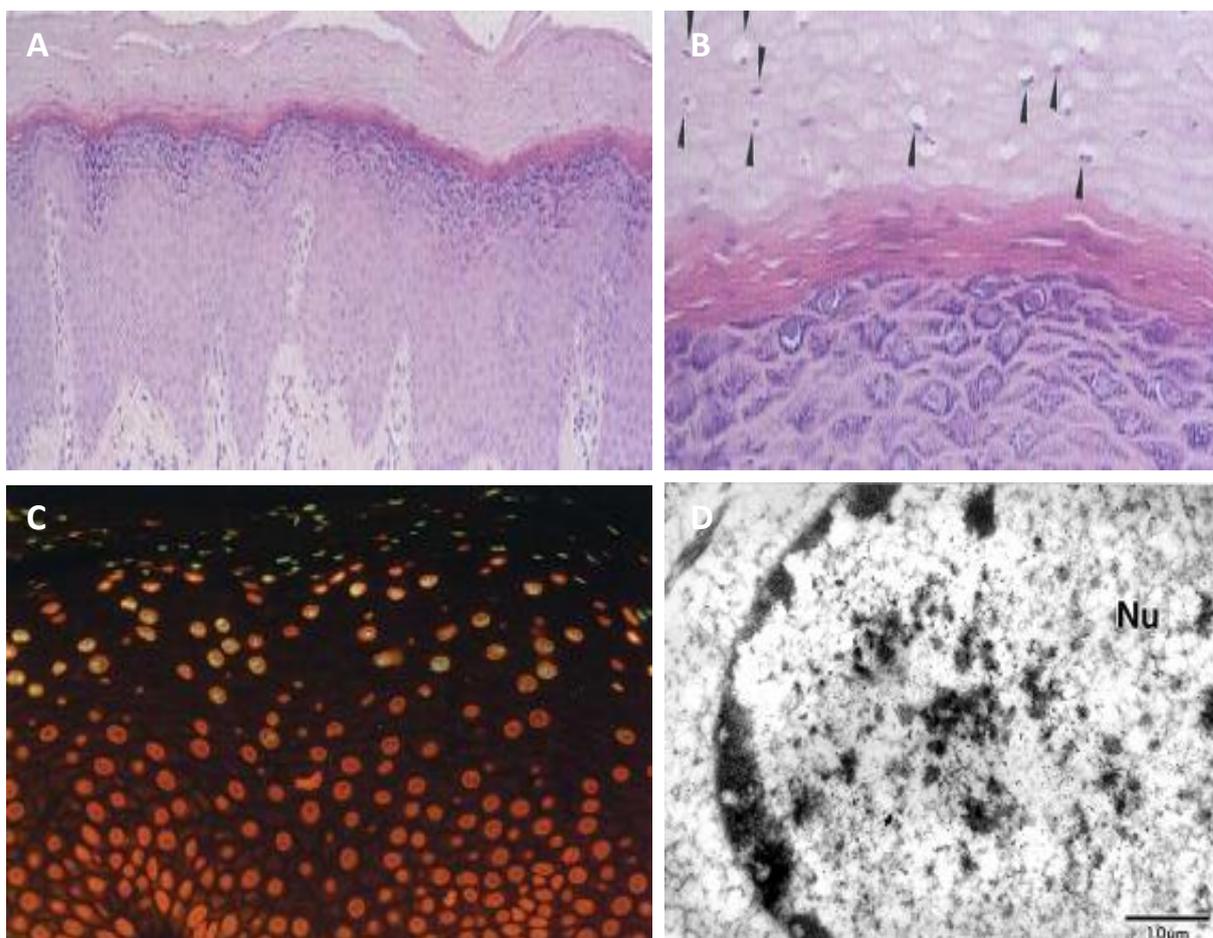


Figura 2 - Características histopatológicas da epiderme de indivíduos afetados pela QL. Secção de epiderme anormal corada com hematoxilina e eosina evidenciando hiperqueratose, com espessamento das camadas granular e córnea (A) e retenção de núcleos na camada córnea, apontados pelas setas (B) (ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 1997). Secção de epiderme anormal com marcação imunofluorescente evidenciando a localização da loricrina mutante, marcada em verde, dentro do núcleo dos queratinócitos, marcados em vermelho (C). Microscopia imunoeletrônica mostrando a deposição de grânulos de loricrina mutante (em preto) no núcleo de um queratinócito de indivíduo portador de QL (Nu - Núcleo) (D) (ISHIDA-YAMAMOTO, 2002).

A QL é transmitida de maneira dominante e os sintomas aparecem normalmente logo nos primeiros meses de vida. Os queratinócitos portadores da mutação expressam tanto o tipo mutante quanto o selvagem da proteína loricrina. Essas mutações produzem proteínas mutantes que possuem 22 aminoácidos a mais que a forma selvagem devido a um códon de

parada atrasado que é formado. Além dessa adição, no caso da mutação 709 insC, há uma troca de 91 aminoácidos; em 662 insT, a mudança é de 107 aminoácidos; em 545 insG, ocorre mudança de 146 aminoácidos e em 730 insG, a substituição é de 84 aminoácidos. A lorícina mutante se concentra dentro do núcleo, enquanto o tipo selvagem é igualmente distribuído no citoplasma e no nucleoplasma. A translocação de proteínas para o núcleo é realizada pelas proteínas da família das importinas e é determinada por pequenas sequências de aminoácidos conhecidas como sequências de localização nuclear (SLN). Não existe uma sequência consenso, mas a maioria das SLN possui alta quantidade de aminoácidos básicos, e podem ser sequências contínuas ou bipartidas (NIGG, 1997). A lorícina é uma proteína rica em glicina e o gene contém muitos códons GGX que codificam para esse aminoácido. A inserção de um nucleotídeo nessa sequência causa uma mudança de fase de leitura que cria vários códons AGG e CGG, que codificam para arginina. A lorícina mutante possui, devido a isso, alta quantidade de arginina e contém SLN bipartidos (KORGE *et al.*, 1997).

A lorícina mutante concentrada no núcleo interfere nos processos regulatórios da apoptose e da divisão celular durante a diferenciação terminal dos queratinócitos. Em culturas de queratinócitos HaCaT, foi observada a indução de morte celular programada através do processamento e ativação da procaspase-14 após transfecção e expressão de um vetor contendo a sequência codificante da lorícina selvagem, fato não observado nos queratinócitos transfectados com vetores contendo a mutação 730 insG na sequência do gene lorícina (YONEDA *et al.*, 2010a). Em outro estudo recente, observou-se que a expressão da lorícina mutante provoca liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) em culturas de queratinócitos HaCaT, com subsequente ativação do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR 2) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o que promove a fosforilação de diversas proteínas componentes de vias de transdução de sinal relacionadas à multiplicação e sobrevivência celular. Especulou-se que essa ativação liga as mutações observadas no gene lorícina à rápida proliferação celular observada nos modelos celulares de QL (YONEDA *et al.*, 2010b).

Ocorreram algumas tentativas de se criar animais com diferentes anormalidades no gene lorícina. Camundongos transgênicos superexpressando lorícina ou expressando lorícina mutante contendo uma grande deleção na porção central não mostraram nenhuma característica fenotípica aberrante. Esses camundongos foram analisados sob microscopia de campo claro e microscopia eletrônica, não sendo observada nenhuma anomalia morfológica ou patologia evidente nos tecidos (YONEDA *et al.*, 1993).

Suga e colaboradores em 2000 geraram camundongos que expressam loricrina mutante pela inserção de um transgene que mimetiza uma mutação identificada previamente no gene loricrina e que causa a QL. Através de mutagênese mediada por reação em cadeia da polimerase (PCR), realizou-se a inserção de uma citosina na sequência codificante do gene loricrina, que foi posteriormente injetado nos embriões dos animais. Essa mutação de ponto causou uma mudança de fase de leitura que modificou os últimos 86 aminoácidos da proteína além de aumentá-la em 22 aminoácidos. As manifestações da pele dos camundongos foram bastante similares às dos pacientes portadores de QL. Eles também demonstraram que a porção c-terminal da loricrina mutante desses camundongos possui SLN. Além disso, eles cruzaram os camundongos transgênicos com camundongos *knockout* para o gene da loricrina e identificaram um fenótipo mais severo. Isso sugere que a função disruptiva da loricrina mutante não requer nenhuma interação com a loricrina selvagem.

Koch e colaboradores em 2000 geraram camundongos deficientes em loricrina (*knockout*) que mostraram um atraso na formação da barreira epidérmica. Ao nascimento, esses camundongos pesavam menos e desenvolveram eritrodermia. Além disso, os animais apresentaram maior propensão à descamação e a pele possuía maior suscetibilidade a estresse físico. Esse fenótipo, entretanto, mostrou-se transiente e prevaleceu por apenas 4 a 5 dias. A presença de um mecanismo compensatório para prevenir o desenvolvimento de um fenótipo mais severo foi sugerida. Esse mecanismo envolveria um aumento na expressão de outras proteínas do ECC, em particular de dois membros da família das PPRP e a proteína repetina, que pertence à família das proteínas S100. Mutações nulas no gene da loricrina ainda não foram relatadas em doenças humanas, mas pacientes nascidos com uma desordem de pele autocurável similar à ictiose lamelar podem ser portadores de tais mutações.

O tratamento da doença envolve normalmente a amenização da queratodermia e a prevenção da auto-amputação através da remoção cirúrgica das bandas de constrição digitais. As opções de tratamento da queratodermia incluem queratolíticos e retinóides. Os retinóides etretinato e isotretinoína vêm sendo usados com sucesso em alguns pacientes com queratodermia loricrina para reversão da queratodermia e também do *pseudoainhum*. Entretanto, os efeitos retornam uma vez a administração do medicamento interrompida (ALI *et al.*, 2006). Acredita-se que o efeito terapêutico dos retinóides resida na diminuição da coesão celular epitelial e inibição da queratinização patológica. Entretanto, tem-se demonstrado que as faixas constrictivas consistem de tecido conjuntivo fibroso, assemelhando-se a tecido cicatricial, o que levanta dúvidas quanto à maneira como os retinóides aromáticos podem reverter esse processo (CAVALCANTE *et al.*, 2003).

► JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

As doenças genéticas acarretam um grande impacto no futuro dos afetados, de suas famílias e da comunidade. Mensurar o impacto destas doenças torna-se relevante para demonstrar aos formuladores de políticas públicas e a outros profissionais a importância de tais doenças na saúde pública. Analisando o período 1995-1997 no Instituto Fernandes Figueira, da FIOCRUZ, referência terciária do Sistema Único de Saúde (SUS) na região metropolitana do Rio de Janeiro, 8,4% das internações compreenderam indivíduos portadores de doença genética. A mortalidade hospitalar no período foi de 1,9%, sendo 35% desses óbitos verificados em pacientes portadores de desordens que têm como causa alterações no DNA. Estatísticas semelhantes parecem ocorrer em outras cidades metropolitanas do país, como Porto Alegre e São Paulo.

No Brasil, os resultados do Projeto Genoma Humano refletiram de forma favorável na formação de grupos de pesquisa em genética humana. Esses resultados estimularam, também, a formação de consórcios sul-americanos, como foi o caso para as doenças metabólicas. Além disso, houve grande motivação ao aprimoramento e à aplicação de refinadas técnicas laboratoriais, disponíveis anteriormente apenas em centros de pesquisa, na rotina clínica. Dessa forma, foi observado o crescimento de um novo mercado de trabalho voltado para a genética médica. A genética médica no Brasil, historicamente, teve sua origem na década de 1960 por geneticistas humanos provenientes das ciências biológicas; nas últimas décadas, contudo, tornou-se uma especialidade médica com programas de residência médica e pós-graduação com interesses específicos voltados para as doenças genéticas.

De igual importância foi a antecipação da comunidade científica para o estudo das implicações bioéticas das pesquisas genéticas em seres humanos implicando, como consequência, na criação dos Comitês de Ética em Pesquisa vinculados ao Conselho Nacional de Saúde, já em vigor no Brasil desde 1995.

Independentemente dos centros de excelência acadêmica e das agências de fomento à pesquisa estarem motivados e sensibilizados para a questão das doenças genéticas, inexistem programas epidemiológicos nacionais que visem delinear o espectro das doenças genéticas e, conseqüentemente, suas frequências na população brasileira. Um segundo problema que pode ser levantado refere-se à localização desses serviços especializados e, portanto, ao número de famílias que têm acesso a eles. Podemos

constatar que esses serviços estão localizados exclusivamente nos grandes centros urbanos. Em Minas Gerais, por exemplo, limita-se à capital, Belo Horizonte.

As doenças genéticas são relativamente raras e quando detectadas estão, muitas vezes, intimamente ligadas a uniões consanguíneas, ou seja, casamentos entre indivíduos aparentados, os quais aumentam a possibilidade de encontro dos alelos raros. No nosso estado, essas uniões consanguíneas acontecem, prioritariamente, no interior, na zona rural, onde as condições de acesso a serviços especializados são mínimas, se não inexistentes.

O presente estudo faz parte do projeto “Consolidação do Serviço de Apoio Diagnóstico de Doenças Genéticas para o SUS” - Projeto PPSUS, EFP - 00001324, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob parecer nº ETIC 0414.0.203.000-09 (anexos). O projeto visa à investigação de doenças genéticas em que os indivíduos afetados e as respectivas famílias possam vir a se beneficiar do diagnóstico, acompanhamento e aconselhamento genético. O trabalho também busca iniciar no Estado de Minas Gerais um mapeamento da distribuição de afecções genéticas específicas. Esse projeto teve início em 2006 (Edital 005/06 - Programa de Pesquisa para o SUS - FAPEMIG, Projeto: PROJ_107_8846697) e, desde então, foram diagnosticadas clínica e molecularmente três patologias hereditárias (SOUZA *et al.*, 2008) e realizado aconselhamento genético para mais de 200 indivíduos. Também foi realizada a formação dos profissionais locais envolvidos com a saúde pública promovendo, assim, a divulgação e conhecimento da genética no SUS. Foi estabelecida uma rede de serviços de apoio diagnóstico a qual se pretende ampliar visando consolidá-la como referência para o SUS do estado de Minas Gerais.

Um dos objetivos desse projeto é a descentralização dos atendimentos. Para tanto, é realizado um trabalho conjunto do Internato Rural da Escola de Medicina da UFMG, com especialistas de outros departamentos dessa mesma Escola, com o Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e o SUS formando uma rede de conhecimentos que levam as informações (avaliação clínica e molecular, acompanhamento, tratamento e aconselhamento genético) para toda a comunidade local que vive e, de certa forma, sofre com a família dos afetados. Também há uma contribuição com o mapeamento dessas doenças no estado de Minas Gerais.

Foram propostas, inicialmente, seis doenças hereditárias com história familiar descrita: Lipofuccinose Neuronal, Distonia Responsiva ao Dopa, Adrenoleucodistrofia, Aniridia, Doença de Gaucher e Queratodermia Loricrina, cada uma delas como um subprojeto.

Este trabalho apresenta o subprojeto Queratodermia Loricrina. No presente estudo, foi realizada uma avaliação molecular do gene loricrina de indivíduos pertencentes a uma família de Minas Gerais. A avaliação clínica levantou a suspeita de queratodermia loricrina em alguns indivíduos dessa família, o que gerou a necessidade de se fazer um estudo molecular para a confirmação ou refutação do diagnóstico. O estabelecimento do diagnóstico é de fundamental importância para uma avaliação mais clara das melhores estratégias de tratamento dos afetados, para o conhecimento da progressão típica da doença e para o aconselhamento genético familiar. A falta de diagnóstico leva à perda do interesse pela maior parte dos médicos, com evidente repercussão no acompanhamento clínico dos afetados, que se sentem muito frequentemente abandonados. Além disso, o conhecimento trás a compreensão, a desmistificação e, portanto, a inserção na sociedade.

O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na desordem apresentada nesse estudo pode auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos e em uma melhor compreensão dos fenômenos ocorridos durante a diferenciação dos queratinócitos e na formação do ECC, colaborando também para a elucidação de mecanismos relacionados a outras desordens.

OBJETIVO

- Analisar o gene loricrina em indivíduos de uma família de Minas Gerais para confirmação ou refutação da suspeita de queratodermia loricrina.

MATERIAIS E MÉTODOS

► CASUÍSTICA

A avaliação dos indivíduos afetados foi feita pelo dermatologista Paulo Benevenuti Júnior (CRM: MG40343). A eleição do gene loricina como candidato funcional foi realizada baseada em literatura pesquisada nos bancos de dados OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) e PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

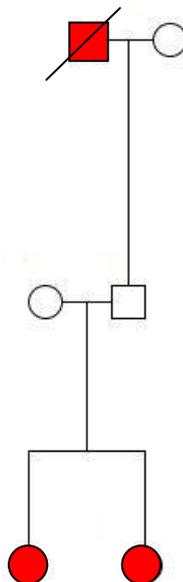
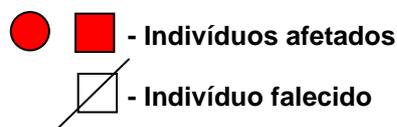


Figura 3 - Heredograma da família estudada



A família estudada no presente trabalho é composta pelo pai - identificado como CRD, e mãe - identificada como MAD, ambos não afetados; e duas filhas - identificadas por TND (a mais velha) e TD, ambas afetadas (Figura 3). As análises genéticas foram feitas a partir de material coletado dos quatro indivíduos. Há relato de que o avô paterno falecido apresentava as mesmas características clínicas das meninas afetadas. O atendimento foi realizado em 2006 e, na época, as garotas afetadas tinham 14 e 13 anos de idade. Na avaliação clínica, foi observado que ambas apresentavam uma hiperqueratose palmoplantar

difusa com um aspecto de “favos-de-mel” e ausência de *pseudoainhum*, além de uma ictiose não eritrodérmica generalizada leve. Não há histórico de cosanguinidade relatado pela família.

► EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico do sangue periférico dos indivíduos foi realizada através de precipitação alcoólica utilizando o *Puregene® DNA Purification Kit* da Qiagen, no Instituto Hermes Pardini, segundo orientações do fabricante.

A concentração de DNA e a relação DNA-proteína (nível de pureza) nas soluções obtidas após a extração foram determinadas por análise espectrofotométrica no aparelho *WPA UV 1101 Biotech photometer* utilizando comprimento de onda de 260nm e o quociente 260nm/280nm, respectivamente. As amostras foram diluídas à concentração de 100 ng/μL e armazenadas a -20 °C.

► CONFECÇÃO DOS INICIADORES

A sequência do gene loricrina utilizada para a confecção dos *primers* usados na amplificação e sequenciamento dos éxons 1 e 2 e utilizada como sequência referência para análise das sequências dos indivíduos foi obtida no *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>, código ENSG00000203782). Esse mesmo arquivo foi pesquisado para se obter dados sobre variantes alélicas descritas e outras informações.

Três pares de *primers* foram usados na amplificação e sequenciamento dos éxons. Os iniciadores usados nas reações de amplificação e de sequenciamento do éxon 1 e do segmento final do éxon 2 foram desenhados utilizando o programa *PRIMER 3 v.0.4.0*. O par de iniciadores usados nas reações de amplificação e sequenciamento do primeiro (maior) segmento do éxon 2 foram os descritos por S. Song e colaboradores em 2008. As sequências dos iniciadores, seus respectivos locais de anelamento e o tamanho dos *amplicons* obtidos são mostrados na figura a seguir (Figura 4).

A especificidade dos iniciadores foi avaliada através da ferramenta *Primer-BLAST* disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.

Os iniciadores destinados à amplificação e sequenciamento do éxon 2 foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.), onde foram submetidos a desbloqueio, dessalinização, liofilização e tiveram qualidade avaliada por espectrometria de massa. Os iniciadores destinados à amplificação e seqüenciamento do éxon 1 foram sintetizados pela empresa Bioneer onde, além de passarem pelos processos descritos anteriormente, foram purificados através do *Bio-RP purification system*. Os *primers* foram eluídos para estocagem a 50 pmol/μL.

► AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

A amplificação das regiões de interesse foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi adotado um protocolo padrão, utilizado no Laboratório de Genética Animal e Humana da UFMG, para as concentrações e quantidades dos reagentes necessários por reação, na amplificação do éxon 1 e do segundo fragmento do éxon 2: 31,2 μL de água Mili-Q[®] autoclavada; 5 μL de tampão PCR 10x (Invitrogen); 1 μL de dNTP 10 mM (Invitrogen); 1,5 μL de solução de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen); 0,5 μL de *primer forward* e 0,5 μL de *primer reverse* a 10 pmol/μL; 0,3 μL de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase* 5 U/μL (Invitrogen) e 10 μL de DNA a 100 ng/μL, resultando em um volume final de reação de 50 μL.

Para otimizar a amplificação dos segmentos, foram necessárias algumas adaptações do protocolo de modo a aumentar a estringência da reação, permitindo a amplificação dos produtos específicos esperados e eliminação de fragmentos espúrios. Essas adaptações foram feitas após padronização das reações nas quais se utilizou DNA humano diverso dos indivíduos estudados, de modo a não se desperdiçar o DNA de interesse. As adaptações foram: para amplificação do éxon 1, utilizou-se volume de 0,5 μL de cada iniciador, 2 μL de MgCl₂, 10 μL de Betaína 5M (Invitrogen) e 600 ng de DNA por reação; para amplificação do segundo fragmento do éxon 2, utilizou-se volume de 3 μL de cada iniciador e 3 μL de MgCl₂ por reação. As alterações nos volumes dos reagentes refletiram no volume de água utilizado em cada reação a fim de se manter o volume final de 50 μL e por conseqüência a concentração final esperada de cada reagente.

A amplificação do primeiro fragmento do éxon 2 foi realizada utilizando o kit *AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase* da Invitrogen segundo protocolo padrão do fabricante, sendo utilizada a solução tampão B e 500 ng de DNA por reação. O volume final das reações foi de 50 µL.

Para a amplificação e sequenciamento dos fragmentos, foram utilizados os termocicladores automáticos MJ96+ e MJ96G da Biocycler.

O programa adotado para a amplificação do éxon 1 e do segundo fragmento do éxon 2 envolveu uma desnaturação inicial do DNA por 2 minutos à 96°C, seguida de uma ativação enzimática e continuação da desnaturação inicial por 3 minutos à 94°C, e posteriormente 38 ciclos envolvendo 1 minuto de desnaturação à 94°C, 1 minuto de anelamento dos iniciadores com temperaturas de 50°C o fragmento contendo o éxon 1 e 57°C para o segundo fragmento do éxon 2, e 30 segundos de extensão à 72°C. Uma última etapa de 3 minutos foi destinada para uma extensão final das fitas à 72°C. O programa adotado para a amplificação do primeiro fragmento do éxon 1 foi o descrito por S. Song e colaboradores em 2008, com alteração da etapa inicial de desnaturação e ativação enzimática, a qual foi realizada por 5 minutos ao invés de 2 minutos. Após o término das reações, as amostras permaneciam na temperatura de 4°C até serem retiradas do aparelho e eram guardadas na geladeira a 4°C.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose (Agargen) 3% em TBE (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). Após a montagem do gel na cuba, foi utilizada voltagem de 120 volts durante a eletroforese. Após esse processo, os géis de agarose eram visualizados sob a incidência de luz ultravioleta para se evidenciar as bandas. Foram utilizados padrões moleculares de 50 pb (*50 bp DNA ladder*, 1 µg/µL, Invitrogen) e 100 pb (*100 bp DNA Ladder*, New England Biolabs, Inc.), na quantidade e concentração indicadas pelos fabricantes, para identificação das bandas de interesse pelo tamanho.

A purificação dos amplicons de interesse gerados a partir do DNA dos pacientes foi feita através do corte e remoção das bandas de interesse do gel e purificação das mesmas utilizando o kit de purificação *Wizard® SV gel and PCR clean-up System* da Promega segundo orientações do fabricante.

A quantificação dos produtos de PCR purificados foi feita utilizando o espectrofotômetro *Nano Drop* modelo ND-1000.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, da Applied Biosystems, segundo protocolo indicado pelo

fabricante com algumas alterações. Reagentes (quantidade por reação): 1 µL de Big Dye v.3.1 com concentração padrão do kit; 1 µL de tampão de sequenciamento 5x com concentração padrão do kit; 2 µL de primer a 0,8 pmol/µL; a quantidade do produto de PCR utilizada foi ajustada dependendo da quantificação verificada, de modo a ser usado entre 3 ng e 10 ng para o éxon 1 e para o segundo fragmento do éxon 2, e 10 ng a 40 ng para o primeiro fragmento do éxon 2, de acordo com orientações encontradas no manual do kit; da mesma maneira, o volume de água Mili-Q® foi ajustado de acordo com o volume de produto de PCR purificado utilizado, de modo a se obter um volume final de reação de 10 µL. Reação: Etapa inicial de desnaturação de 3 minutos a 96°C, seguida de 44 ciclos constituídos de 3 passos: desnaturação por 30 segundos a 96°C, anelamento por 15 segundos a 50°C e extensão por 4 minutos a 60 °C. Ao término da reação, as amostras eram mantidas a 4°C até serem colocadas no freezer a - 20°C para serem posteriormente precipitadas.

Todas as reações de sequenciamento foram repetidas ao menos uma vez, sendo realizadas utilizando-se produtos de PCR provenientes de, no mínimo, duas reações distintas para cada indivíduo.

A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada segundo sugestão presente no manual do *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, da Applied Biosystems, com algumas alterações: adição de 1 µL de EDTA 125 mM, 1µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol 100%; homogeneização e manutenção a temperatura ambiente por 15 minutos; centrifugação a 6000 rpm por 25 minutos; retirada do sobrenadante e adição de 35 µL de etanol 70%; centrifugação a 4°C, 4.500 rpm por 10 minutos; retirada do sobrenadante e secagem dos tubos.

A leitura dos produtos obtidos nas reações de sequenciamento foi efetuada utilizando o sequenciador automático ABI 3130, da Applied Biosystems, de acordo com orientações do fabricante.

O exame visual dos eletroforegramas e a análise das sequências geradas foram realizados utilizando o programa *Codon Code Aligner v.2.0.6.*

Devido a dificuldades encontradas no sequenciamento do primeiro fragmento do éxon 2, no qual não foi possível observar picos com boa qualidade ao longo de toda a extensão dos eletroforegramas, mesmo após inúmeras alterações nos protocolos, os produtos de PCR não purificados foram enviados juntamente com os respectivos iniciadores à empresa MacroGen Inc. (www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp), de

acordo com as instruções de envio indicadas, onde foram purificados e sequenciados de acordo com os protocolos adotados pela empresa.

► ANÁLISE PROTÉICA

As sequências de aminoácidos foram previstas com auxílio do banco de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>, arquivo ENSG00000203782) e do programa *Codon Code Aligner v.2.0.6.*. As sequências protéicas foram avaliadas quanto à presença de SLN utilizando o software *PredictNLS* disponível em www.predictprotein.org.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

► ANÁLISE DO CASO

Pesquisa realizada no banco de dados OMIM confirmou o gene loricrina como suspeito de estar relacionado aos sintomas observados. As queratodermias palmoplantares, bem como as ictioses, formam grupos de desordens bastante heterogêneos, podendo ser causadas por mutações em diferentes genes. A associação entre hiperqueratose palmoplantar difusa e ictiose não eritrodérmica generalizada, sem a presença de outros sintomas, é típica de casos de mutações no gene loricrina. Existem diversas desordens causadas por mutações em outros genes, por exemplo, codificantes para alguns tipos de queratinas, em que se observa a ocorrência de hiperqueratose palmoplantar difusa e, em alguns casos, como em indivíduos portadores de mutações no gene *pomp* (codificante para a proteína de maturação de proteassomos), existe concomitantemente ictiose. Entretanto, nesses casos e em outros tipos de queratodermias palmoplantares, os sintomas em comum com o caso em questão possuem algumas diferenças clínicas evidentes e diversas características díspares estão associadas, como má formação das unhas e dos dentes, deformidades nos dedos, neuropatias, retardo mental, surdez, cardiopatias, entre outras. Nos relatos de QL descritos na literatura, observa-se padrão de herança dominante e penetrância completa, o que levantou dúvidas quanto ao diagnóstico já que na família estudada CRD não é afetado. Porém, levando-se em conta o fenótipo característico evidenciado em TND e TD, suspeitou-se de uma mutação causadora dos sintomas, no gene loricrina, que apresentaria penetrância incompleta.

► SEQUENCIAMENTO

Não foi encontrada nenhuma alteração no éxon 1 dos indivíduos analisados. O éxon 1 não é codificante e possui provável função relacionada com o processo de tradução, transporte ou meia-vida do mRNA no citoplasma. Não foi evidenciada alteração no sítio doador de *splicing* ou próximo a ele (Figura 5).

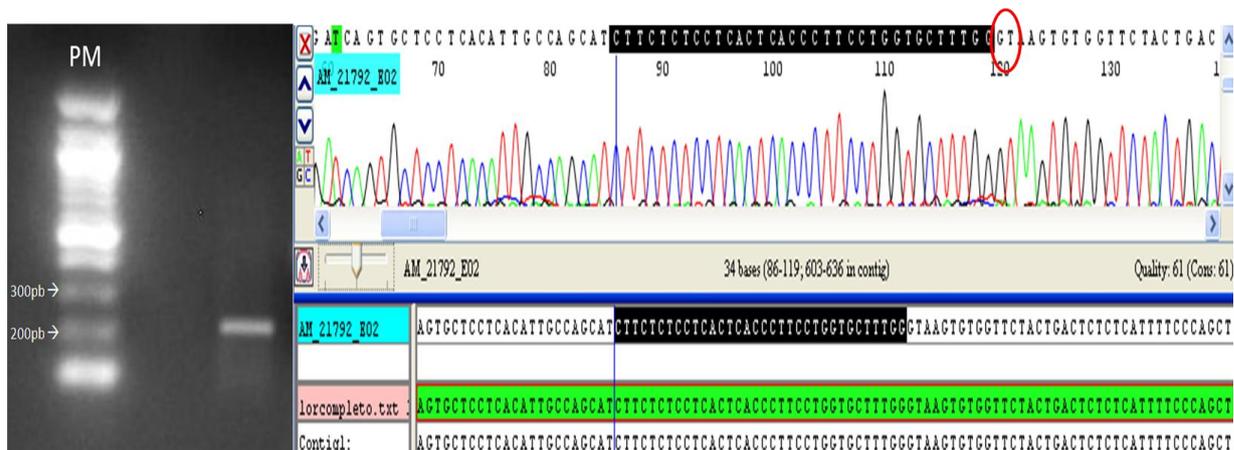


Figura 5 - Amplificação e seqüenciamento do éxon 1. A foto do gel de eletroforese mostra a amplificação de uma banda de 225 pb contendo o éxon 1 em um dos indivíduos. (PM - Padrão de peso molecular; pb - pares de base). O seqüenciamento mostrou não haver alteração no éxon 1 (seqüência sombreada em preto) de acordo com a seqüência referência (lorcompleto.txt). Não houve alteração no sítio doador de *splicing* (círculo vermelho).

Não foi encontrada nenhuma alteração no segundo segmento do éxon 2 (Figura 6).

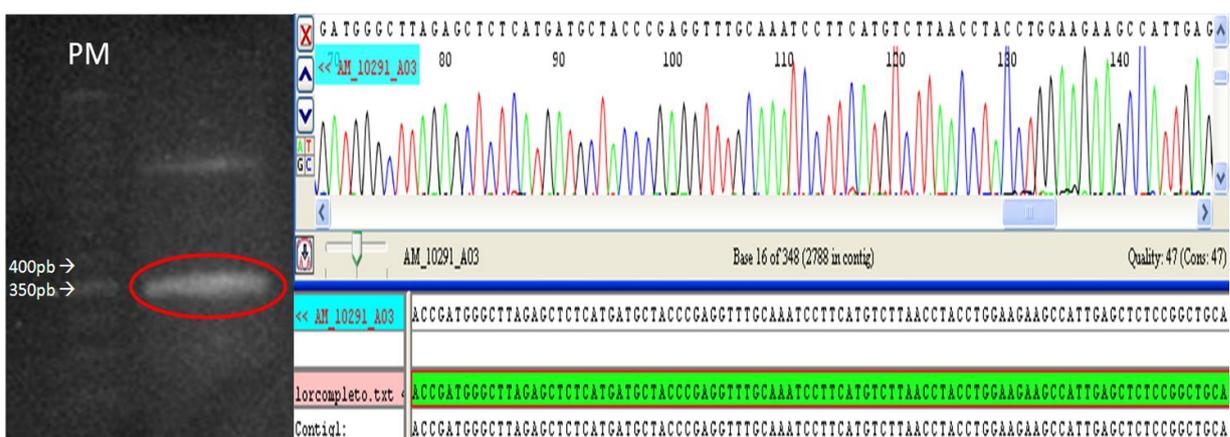


Figura 6 - Amplificação e seqüenciamento do segundo segmento do éxon 2. A foto do gel de eletroforese mostra a amplificação de uma banda de 377 pb (círculo vermelho) de um dos indivíduos (PM - Padrão de peso molecular; pb - pares de bases). O seqüenciamento mostrou não haver alterações nessa região de acordo com a seqüência referência (lorcompleto.txt). Parte da seqüência de um dos indivíduos é mostrada na figura.

O seqüenciamento do primeiro segmento do éxon 2 evidenciou a presença de três alterações pontuais e duas inserções nos indivíduos analisados. Não houve alteração no sítio acceptor de *splicing* ou próximo a ele (dado não mostrado).

Todas as alterações pontuais encontradas se localizam entre o códon de iniciação e o códon de parada da tradução (Figura 12), entretanto são alterações sinônimas, ou seja, compõem códons alternativos para o mesmo aminoácido. A primeira alteração pontual encontrada é uma transição C>T já descrita (rs1143389) e produz um códon alternativo para cisteína. O alelo (T) é bastante freqüente na população (21,3%), sendo, portanto, um

polimorfismo. Esse alelo aparece em homozigose na mãe (MAD), não aparece no pai (CRD), e está presente em heterozigose nas filhas (Figura 7). A segunda alteração pontual encontrada é uma transversão A>C também já descrita (rs1143390) e produz um códon alternativo codificante para glicina. O alelo (C) é bastante frequente na população (44,3%), sendo, portanto, um polimorfismo. Esse alelo aparece em homozigose na mãe (MAD) e nas filhas e em heterozigose no pai (CRD) (Figura 8). A terceira alteração pontual encontrada é uma transição G>A também já descrita (rs12043009) e produz um códon alternativo codificante para glicina. Não há informações sobre frequência na população. Essa alteração encontra-se em heterozigose no pai (CRD) e nas filhas e não foi encontrada na mãe (MAD) (Figura 9).

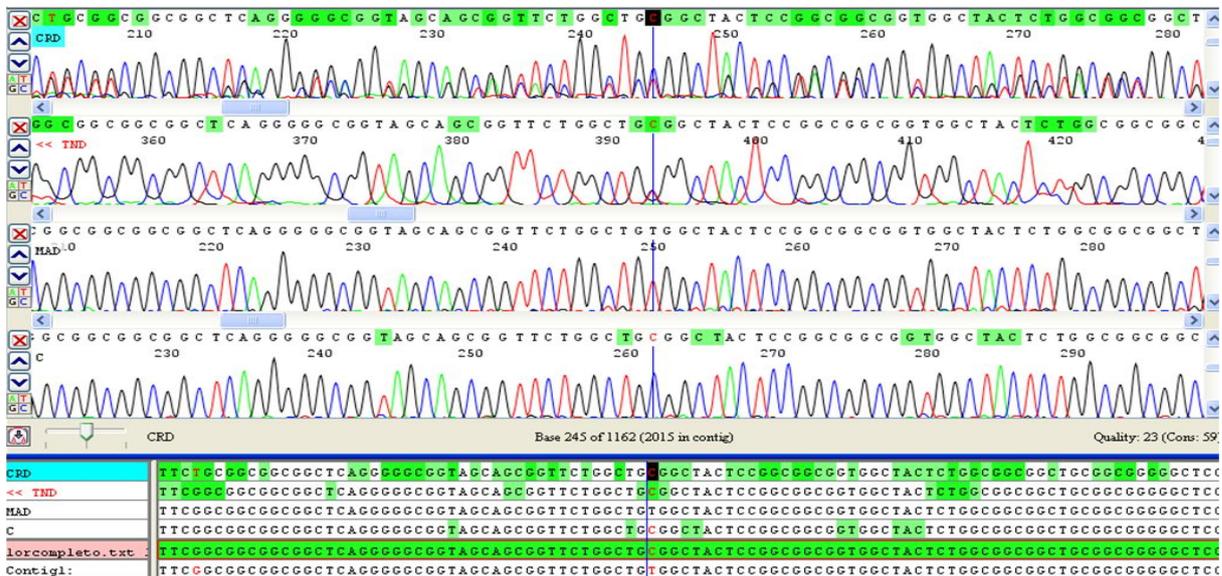


Figura 7 - Alteração C>T. A alteração é indicada pelo traço em azul. Apesar de na sequência do pai (CRD) haver dois picos na posição indicada, a análise visual revelou que ele é homozigoto C/C. A sobreposição evidenciada ocorreu devido a uma inserção identificada nesse indivíduo. As filhas são heterozigotas C/T e na figura a sequência de uma delas (TND) é mostrada. A mãe (MAD) é homozigota T/T. C - controle. As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência referência (lorcompleto.txt).

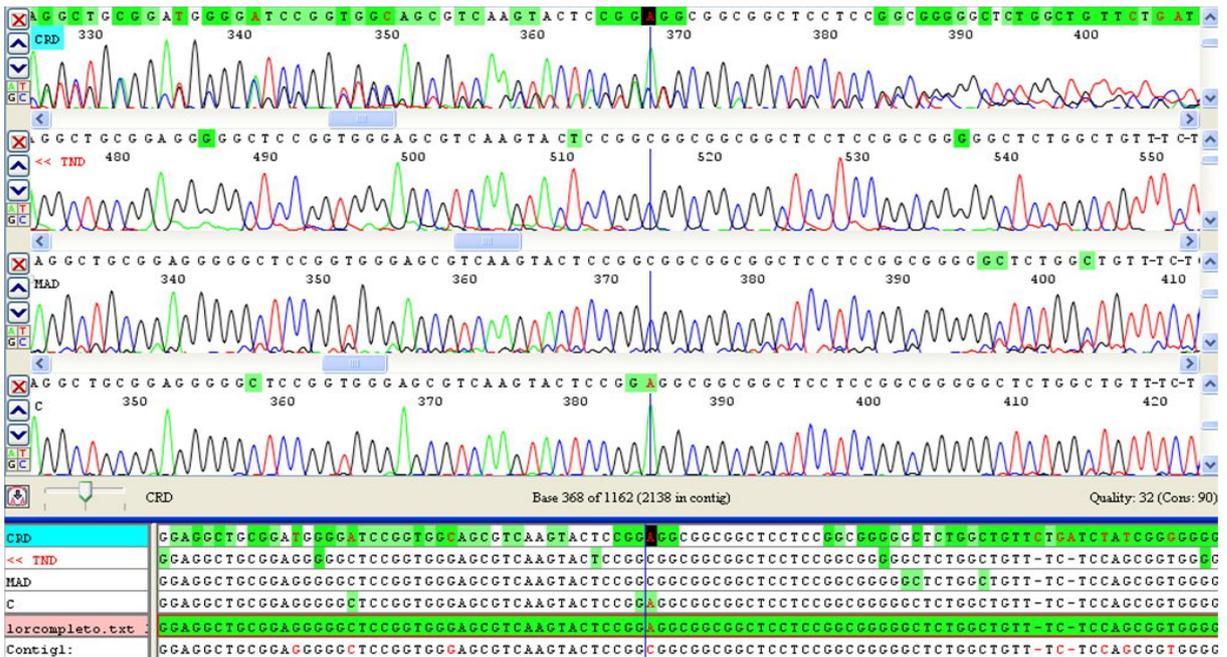


Figura 8 - Alteração A>C. A alteração é indicada pelo traço em azul. O pai é heterozigoto A/C (análise visual considerando a inserção evidenciada nesse indivíduo). As filhas são homozigotas C/C e na figura a sequência de uma delas (TND) é mostrada. A mãe (MAD) é homozigota C/C. C - controle. As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência referência (lorcompleto.txt).

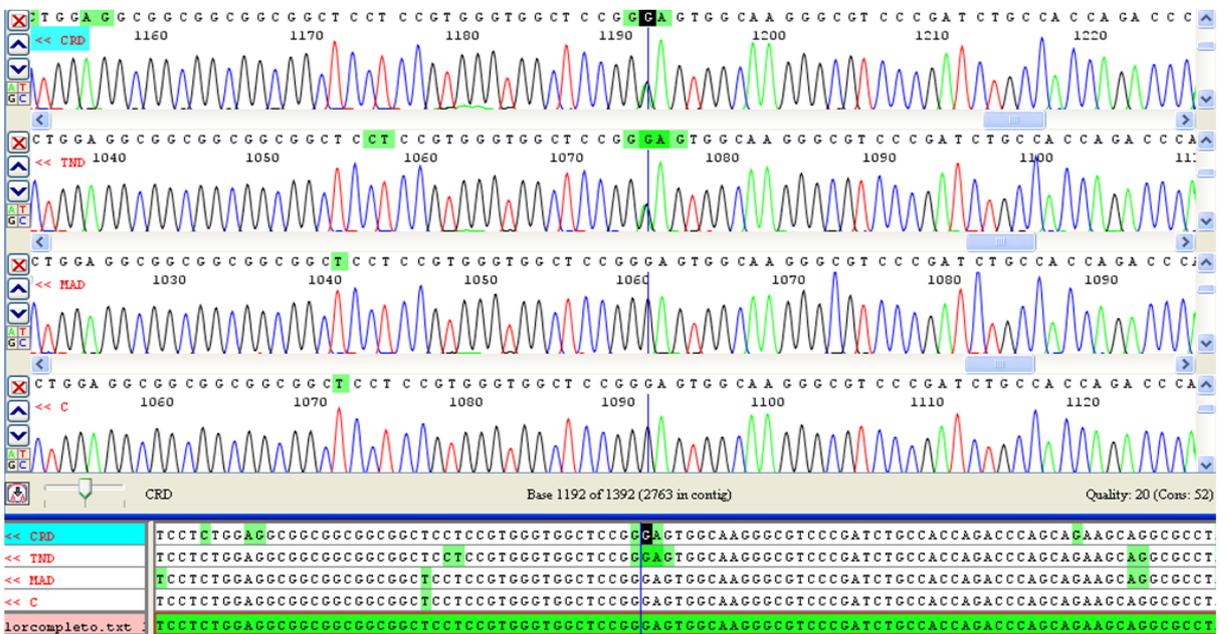


Figura 9 - Alteração G>A. O pai (CRD) é heterozigoto G/A, assim como as filhas. Na figura, a sequência de uma delas (TND) é mostrada. A mãe (MAD) é homozigota G/G. C - controle. As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência referência (lorcompleto.txt).

As inserções encontradas se localizam dentro da região codificadora do éxon 2 (Figura 12). A primeira inserção (ins) identificada se trata de uma inclusão de seis nucleotídeos contendo as bases TGGCGG. Essa alteração não é descrita na literatura e se encontra na posição 139 da sequência transcrita. A inserção provoca a inclusão de duas glicinas na sequência de aminoácidos da proteína. Foi evidenciada em heterozigose no pai (CRD) e nas filhas, não sendo encontrada na mãe (Figura 10).

A segunda inserção identificada se trata de uma inclusão de doze nucleotídeos contendo as bases GGCGGCTCTGGC. Essa alteração já é descrita (rs11272549) e não há dados sobre frequência na população. A inserção provoca a inclusão de uma sequência de aminoácidos glicina-glicina-serina-glicina na proteína. Foi evidenciada em heterozigose no pai (CRD), homozigose na mãe (MAD) e nas filhas e também em heterozigose no indivíduo controle (Figura 11). Um resumo das alterações evidenciadas é mostrado na figura 12.

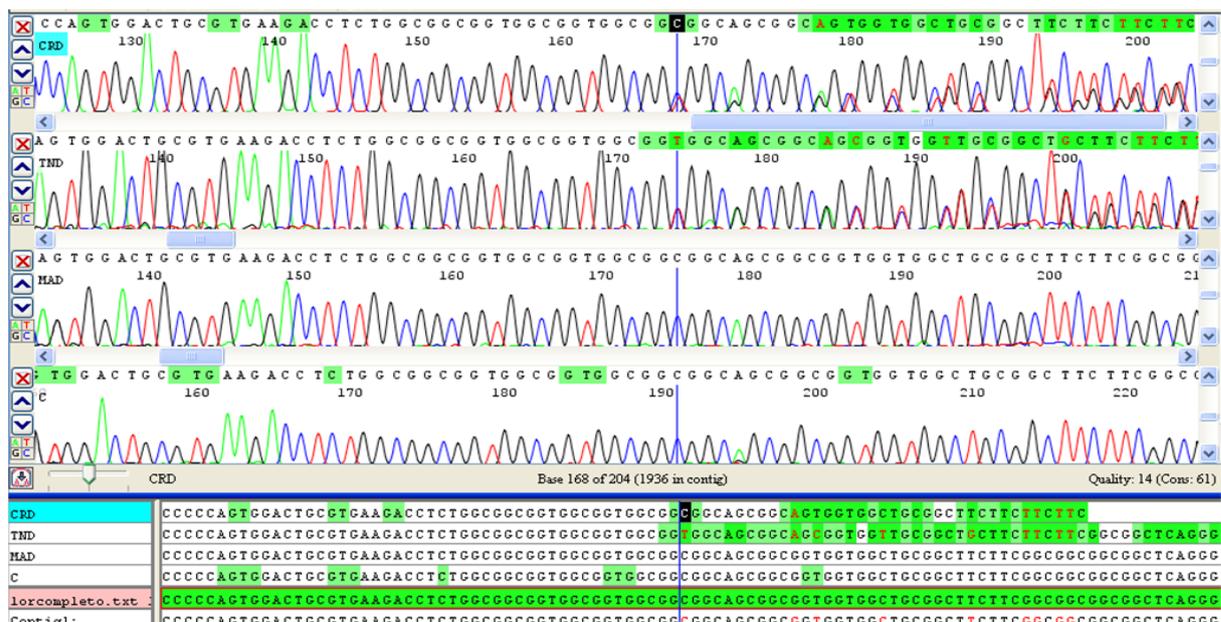


Figura 10 - Ins TGGCGG. O princípio da alteração é indicado pelo traço em azul. A inserção TGGCGG foi inferida visualmente. O pai (CRD) é heterozigoto assim como as filhas. Na figura, a sequência de uma delas (TND) é mostrada. A mãe (MAD) não apresenta a inserção. C - controle. As seqüências foram alinhadas e comparadas com a seqüência referência (lorcompleto.txt).

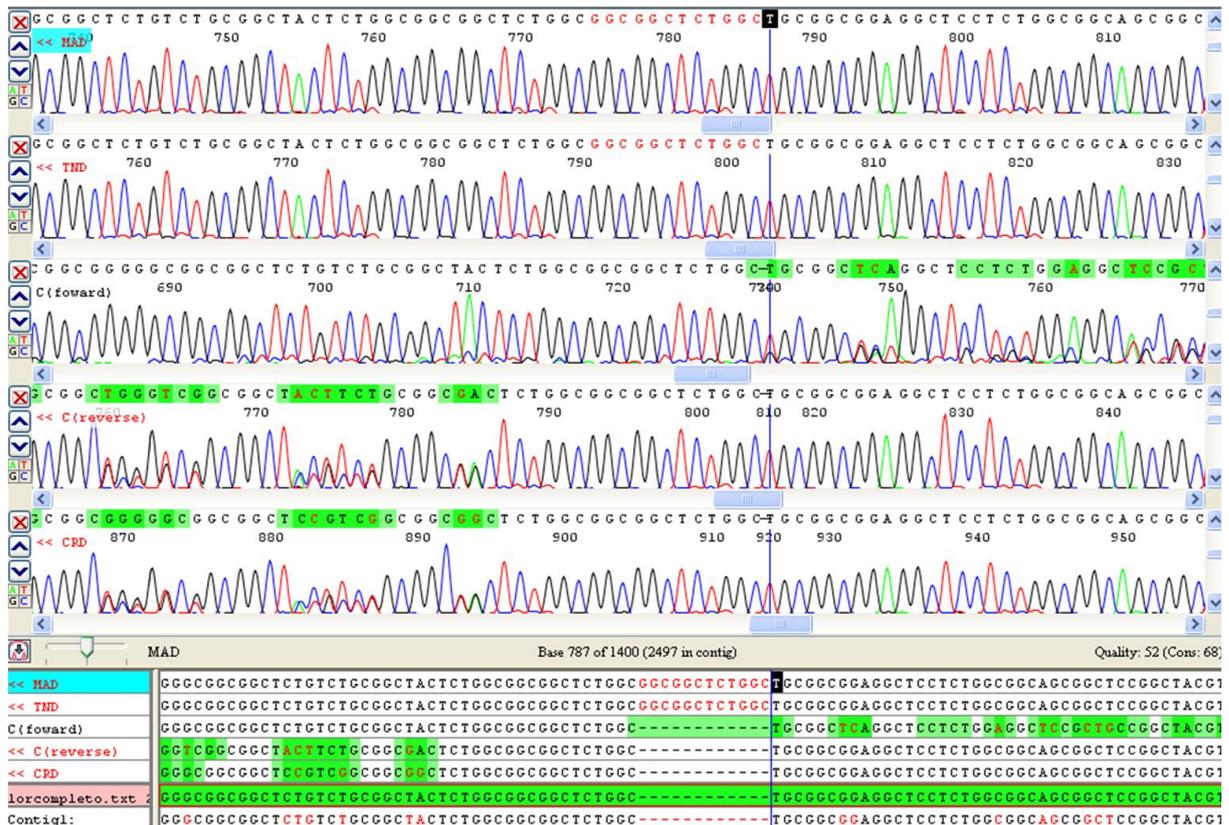


Figura 11 - Ins GGCGGCTCTGGC. A alteração é indicada pelas letras em vermelho. A mãe (MAD) é homocigota assim como as filhas. Na figura, a sequência de uma delas (TND) é mostrada. Devido à sobreposição de picos e ao fato do gene possuir uma sequência altamente repetitiva, erros de alinhamento das sequências do pai e do controle ocorreram. A inserção em heterocigose foi inferida visualmente nesses dois indivíduos avaliando suas sequências *forward* e *reverse*. As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência referência (lorcompleto.txt).

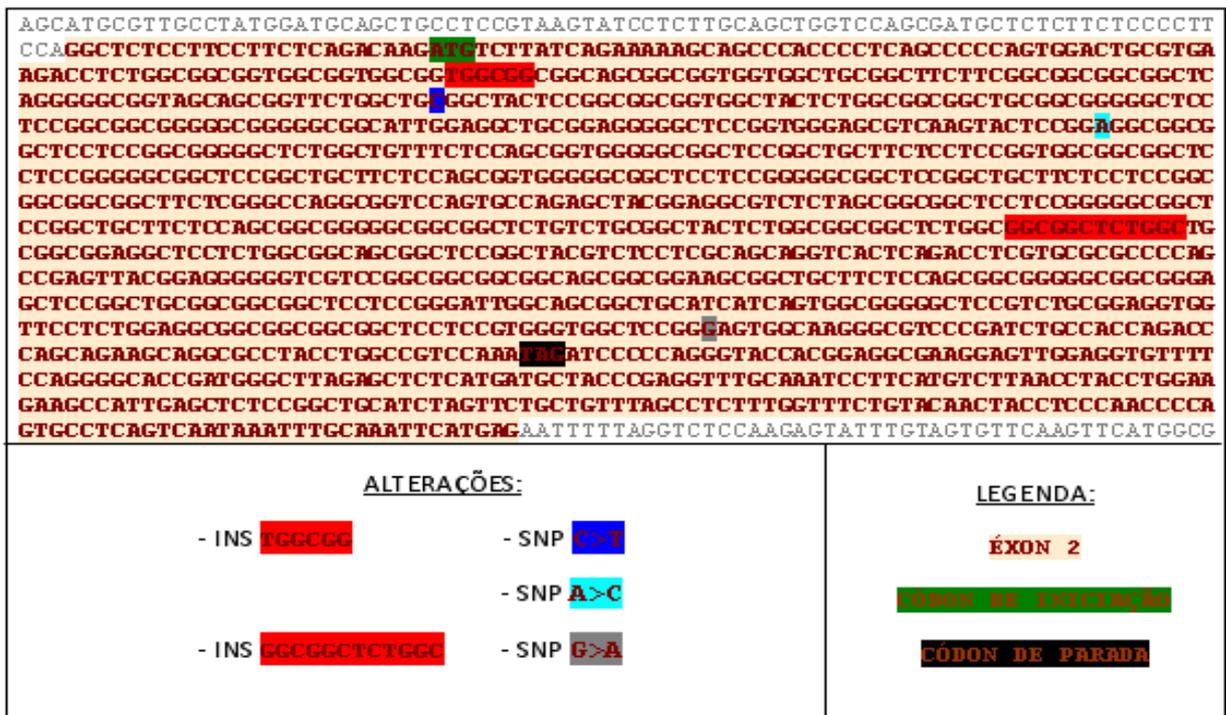


Figura 12 - Localização das alterações encontradas.

Protein Localization Prediction					
Localization prediction in plant					
== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==					
Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index	Intermediate localization prediction	Reliability index	
query Chloroplast	5	Not Secreted,Not Nuclear,Mitochondria or Chloroplast,Chloroplast		2,5,4,8	
Localization prediction in animal					
== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==					
Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index	Intermediate localization prediction	Reliability index	
query Not DNA-binding	4	Not Secreted,Nuclear,Not DNA-binding	2,4,7		
Localization prediction in prokaryotes					
== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==					
Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index	Intermediate localization prediction	Reliability index	
query Extra-cellular	7	Not Cytoplasmic,Extra-cellular	8,6		
Prediction of Nuclear Localization Signals (NLS)					
This protein does not contain a nuclear localization signal					

Figura 14 - Avaliação quanto à presença de SLN na proteína alterada. O círculo vermelho mostra o resultado dado pelo software após a análise. A proteína alterada não possui SLN conhecidas.

O sequenciamento do gene loricrina nos indivíduos da família não evidenciou nenhuma alteração capaz de provocar os sintomas observados por mecanismos conhecidos e, portanto, não é possível confirmar o diagnóstico. A QL é causada pelo acúmulo da proteína mutada no núcleo, onde há uma interferência em processos celulares relacionados à multiplicação e à apoptose. As alterações encontradas não provocam o surgimento de sinais conhecidos de endereçamento da proteína para o núcleo e, portanto, ela provavelmente não é endereçada a esse compartimento celular. Um estudo de avaliação da localização da proteína mutada por marcação e visualização por microscopia de imunofluorescência, semelhante ao realizado em trabalhos anteriores, é necessário para a confirmação dessa hipótese. Vários trabalhos relataram casos semelhantes ao presente, em que sintomas típicos causados por mutações no gene loricrina foram identificados, mas nenhuma alteração causal foi encontrada no gene (AKMAN *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2010; AKIYAMA *et al.*, 1998).

Várias inserções e deleções de 6 ou 12 pares de bases no segundo éxon do gene loricrina são descritas no banco de dados *Ensembl* e não se relacionam a qualquer fenótipo anormal. Essas alterações e outras não descritas são provavelmente bastante comuns na população devido à característica do gene, que possui uma sequência altamente repetitiva, o que aumenta as chances de erro durante a replicação por *slippage* da DNA polimerase. A segunda inserção encontrada nesse estudo (Ins GGCGGCTCTGGC, rs11272549) foi também encontrada em um trabalho que avaliou indivíduos possuindo sintomas típicos já descritos em pacientes portadores da doença (WEI *et al.*, 2010). Nesse estudo, essa mutação também não foi considerada causal, sendo inclusive encontrada nos indivíduos

controle utilizados. Nenhuma outra alteração foi vista no gene. Uma análise da localização da proteína alterada, codificada por esse alelo, marcada com GFP (proteína verde fluorescente), em cultura de células HEK293, mostrou que a mesma possui distribuição celular similar à proteína selvagem.

O programa *PredictNLS* também fornece informações estruturais e bioquímicas da proteína avaliada, além de informar se ela contém possíveis SLN. Foi observado que não existem diferenças estruturais e bioquímicas significativas entre a proteína selvagem e a proteína alterada (dados não mostrados), descartando, a princípio, a possível existência de um novo mecanismo, relacionado à proteína alterada presente nas meninas afetadas, causador dos fenótipos. Outros estudos são necessários para confirmar essa afirmação como, por exemplo, análise de possíveis interações entre a proteína alterada e outras proteínas ou ativação/inibição de vias de transdução de sinal.

A clonagem e sequenciamento dos fragmentos são necessários para confirmação das sequências observadas. Além disso, o sequenciamento de um maior número de indivíduos controle é importante para a avaliação do espectro das alterações encontradas, principalmente em relação à inserção TGGCGG não descrita que, se vista em indivíduos normais, poderá fornecer uma melhor evidência para a refutação da hipótese de um mecanismo não descrito que relacione essa mutação às características dos pacientes.

Existe um outro transcrito descrito para o gene *loricina* no banco de dados *Ensembl*. Entretanto, não existe evidência da existência de proteína por ele codificada, além de não haver alterações descritas encontradas no gene que comprovem a sua existência. Não foram observadas alterações nos sítios doador ou aceptor de *splicing* ou alterações dentro do éxon que levantem suspeitas quanto à expressão desse transcrito nos indivíduos da família. Esse suposto transcrito não possui o primeiro éxon, apresentando somente o segundo, com a remoção de dois nucleotídeos contendo as bases TC na posição 708-709 da sua sequência. A quantidade de transcrito não foi avaliada no estudo. Os modelos animais com alterações no gene *loricina* mostram que a superexpressão, uma menor quantidade do transcrito selvagem ou a completa inexistência de expressão do gene não provoca alterações fenotípicas ou essas ocorrem de maneira transiente. No trabalho de WEI *et al.*, citado anteriormente, as quantidades de proteína selvagem e mutada expressas foram avaliadas por *western blot* e se mostraram normais. Foi evidenciado que o gene *loricina* tem sua expressão alterada em outras desordens da pele, como na psoríase e na dermatite atópica (JARZAB *et al.*, 2009; GIARDINA *et al.*, 2004). Sua expressão alterada, nesses casos, foi vista como um fenômeno secundário, e não causador dos fenótipos.

Novas causas genéticas para os sintomas em questão podem ser avaliadas. Uma estratégia que pode elucidar qual ou quais genes podem estar envolvidos na desordem apresentada é o mapeamento por análise de ligação na família. Um estudo histológico poderá caracterizar melhor o fenótipo, ajudando a prever as possíveis causas das características aberrantes. As queratodermias palmoplantares podem ser causadas por diversos genes e os mecanismos envolvidos não são completamente elucidados. O fenótipo observado pode ser uma variação de algum tipo de queratodermia descrito, principalmente de alguma desordem que apresenta sintomas próximos a QL, como é o caso da Síndrome KLICK (keratosis linearis ichthyosis congenita keratoderma), causada por mutações no gene *pomp*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo avaliou a suspeita de queratodermia lorícrica em indivíduos de uma família de Minas Gerais. Os resultados obtidos não confirmaram a suspeita levantada pela avaliação clínica. O trabalho colaborou para a evidência da alta heterogeneidade das queratodermias palmoplantares, assim como para a percepção de que os mecanismos causadores desses tipos de desordens ainda não são completamente conhecidos. O diagnóstico, nesse caso, não afetaria no tratamento dos indivíduos afetados, já que os métodos de tratamento utilizados atualmente não são específicos, além de serem bastante limitados e apenas paliativos. Entretanto, novos tratamentos para as queratodermias baseados em mecanismos celulares específicos estão em desenvolvimento e, quando estabelecidos, aumentarão ainda mais a necessidade de diferenciação entre diferentes patologias.

A clonagem e sequenciamento dos fragmentos se faz necessária para a confirmação das alterações evidenciadas. Além disso, o sequenciamento de um maior número de indivíduos é essencial para a avaliação do espectro das alterações encontradas, principalmente em relação à inserção TGGCGG não descrita, o que possibilitará uma melhor evidência que não sustente a hipótese de um mecanismo não descrito que relacione essa mutação no gene lorícrica às características dos pacientes. Outros genes devem ser pesquisados e, para tanto, a melhor estratégia é realizar o mapeamento por análise de ligação na família. Uma análise histopatológica de tecidos oriundos dos indivíduos afetados também possibilitará uma descrição mais detalhada do fenótipo, sendo bastante informativo para a suspeição das possíveis causas genéticas relacionadas à doença.

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, M., CHRISTIANO, A.M., YONEDA, K., SHIMIZU, H. *Abnormal cornified cell envelope formation in mutilating palmoplantar keratoderma unrelated to epidermal differentiation complex.* **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, 1998, p. 133-138.

AKM, A., MASSE, M., MIHCI, E., RICAR, G., CHRISTIANO, A., BALL, B., CIFT, M., ALPSOY, E. *Progressive symmetrical erythrokeratoderma: report of a Turkish family and evaluation for loricrin and connexin gene mutations.* **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 33, 2008, p. 582-584.

ALI, M.M.; UPADYA, G.M. *Variant of Vohwinkel's syndrome.* **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 72, 2006, p. 449-451.

BONDESON, M.L.; NYSTRÖM, A.M.; GUNNARSSON, U. et al. *Connexin 26 (GJB2) mutations in two Swedish patients with atypical Vohwinkel (mutilating keratoderma plus deafness) and KID syndrome both extensively treated with acitretin.* **Acta Dermato-Venereologica** v. 86, 2006, p. 503-508.

CANDI, E.; MELINO, G.; MEI, G. et al. *Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein.* **Journal of Biological Chemistry**, v. 270 (44), 1995, p. 26382-26990.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. *The cornified envelope: a model of cell death in the skin.* **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, 2005, p. 328-340.

CAVALCANTE, L. I. S. et al. *Ceratoderma mutilante de Vohwinkel: relato de três casos em uma família.* **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, 2003, p. 311-318.

GEDICKE, M.M.; TRAUPE, H.; FISCHER, B. et al. *Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in loricrin: analysis of a family and review of the literature.* **British Journal of Dermatology**, v. 154, 2006, p. 167-171.

GIARDINA, E., CAPON, F., DE ROSA, MC., MANGO, R., ZAMBRUNO, G., ORECCHIA, A., CHIMENTI, S., GIARDINA, B., NOVELLI, G. *Characterization of the loricrin (LOR) gene as a positional candidate for the PSORS4 psoriasis susceptibility locus.* **Annals of Human Genetics**, v. 68, 2004, p. 639-645.

ISHIDA-YAMAMOTO A., TAKAHASHI H., PRESLAND R.B., DALE B.A., IIZUKA H. *Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma.* **Laboratory Investigation**, v. 78, 1998, p. 1245-1253.

ISHIDA-YAMAMOTO, A. et al. *The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope.* **American Journal of Human Genetics**, v. 61, 1997, p. 581-589.

ISHIDA-YAMAMOTO, A. *Loricrin keratoderma: a novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin.* **Journal of Dermatological Science**, v. 31 (1), 2003, p. 3-8.

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; IIZUKA, H. *Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders.* **Experimental Dermatology**, v. 7, 1998, p. 1-10.

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; KATO, H.; KIYAMA, H. et al. *Mutant loricrin is not crosslinked into the cornified cell envelope but is translocated into the nucleus in loricrin keratoderma.* **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, 2000, p. 1088-1094.

JARZAB, J., FILIPOWSKA, B., ZEBRACKA, J., KOWALSKA, M., BOZEK, A., RACHOWSKA, R., GUBALA, E., GRZANKA, A., HADAS, E., JARZAB, B. *Locus 1q21 Gene Expression Changes in Atopic Dermatitis Skin Lesions: Deregulation of Small Proline-Rich Region 1A*. **International Arch Allergy Immunology**, v. 151, 2010, p. 28-37.

KIELECZAWA, J. *Fundamentals of sequencing of difficult templates: An overview*. **Journal of Biomolecular Technology**, v. 17, 2006, p. 207-217.

KOCH, P.J. *et al.* *Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein*. **Journal of Cellular Biology**, v. 151, 2000, p. 389-400.

KORGE, B.P.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; PÜNTER, C. *et al.* *Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109 (4), 1997, p. 604-610.

MAESTRINI, E.; MÔNACO, A.P.; MCGRATH, J.A. *et al.* *A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome*. **Nature Genetics**, v. 13, 1996, p. 70-77.

MARENHOLZ, M., ZIRRA, D.F., FISCHER, C., BACKENDORF, A., ZIEGLER D., MISCHKE. *Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library*. **Genome Research**, v. 11, 2001, p. 341-355.

NEMES, Z.; STEINERT, P.M. *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. **Experimental Molecular Medicine**, v. 31, 1999, p. 5-19.

NIGG, E.A. *Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation*. **Nature**, v. 386, 1997, p. 779-787.

OJI, V.; TRAUPE, H. *Ichthyoses: differential diagnosis and molecular genetics*. **European Journal of Dermatology**, v. 16, 2006, p. 349-359.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. *The skin: an indispensable barrier*. **Experimental Dermatology**, v. 17, 2008, p. 1063-1072.

SCHMUTH, M.; FLUHR, J.W.; CRUMRINE, D.C. *et al.* *Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma (Vohwinkel syndrome with ichthyosis)*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, 2004, p. 909-922.

SONG, S. *et al.* *A novel c.545-546insG mutation in the loricrin gene correlates with a heterogeneous phenotype of loricrin keratoderma*. **British Journal of Dermatology**, v. 159, 2008, p. 714-719.

SOUTH, A. *et al.* *Human epidermal differentiation complex in a single 2.5 Mbp long continuum of overlapping DNA cloned in bacteria integrating physical transcript maps*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, 1999, p. 910-918.

SOUZA, C.P., VALADARES, E.R., TRINDADE, A.L.C., ROCHA, V.L., OLIVEIRA, L.R., GODARD, A.L.B. *Mutation in intron 5 of GTP cyclohydrolase 1 gene causes dopa-responsive dystonia (Segawa Syndrome) in a Brazilian family*. **Genetics and Molecular Research**, v. 7 (3), 2008, p. 687-694.

STEVEN, A.C.; STEINERT, P.M. *Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes*. **Journal of Cellular Science**, v. 107, 1994, p. 693-700.

SUGA, Y. *et al.* *Transgenic mice expressing a mutant form of loricrin reveal the molecular basis of the skin diseases, Vohwinkel syndrome and progressive symmetric erythrokeratoderma*. **Journal of Cellular Biology**, v. 151, 2000, p. 401-412.

TOULZA, E., MATTIUZZO, N.R., GALLIANO, M.F., JONCA, N., DOSSAT, C. *et al.* Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. **Genome Biology**, v. 8, 2007, R107.

WEI, S., ZHOU, Y., ZHANG, T. D., HUANG, Z. M., ZHANG, X. B., ZHU, H. L., LIANG, B. H., LIN, L., DENG, L. Evidence for the absence of mutations at *GJB3*, *GJB4* and *LOR* in progressive symmetrical erythrokeratoderma. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, 2010, p. 399-405.

XU, X., KAWACHI, Y., NAKAMURA, Y., SAKURAI, H., HIROTA, A., BANNO, T., TAKAHASHI, T., ROOP, D.R., OTSUKA, F. *Yin-yang 1* negatively regulates the differentiation-specific transcription of mouse *loricrin* gene in undifferentiated keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, 2004, p. 1120-1126.

YONEDA, K., DEMITSU, T., MANABE, M., IGARASHI, J., KOSAKA, H., INAGAKI, N., TAKAHASHI, H., KON, A., KAKURAI, M., KUBOTA, Y. Expression of wild-type, but not mutant, *loricrin* causes programmed cell death in *HaCaT* keratinocytes. **Journal of Dermatology**, v. 37, 2010, p. 956-964.

YONEDA, K., DEMITSU T., NAKAI K., MORIUE, T., OGAWA, W., IGARASHI, J., KOSAKA, H., KUBOTA, Y. Activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a cellular model of *loricrin* keratoderma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, 2010, p. 16184-16194.

YONEDA, K., HOHL, D., MCBRIDE, O.W., WANG, M., CEHRS, K.U., IDLER, W.W., STEINERT, P.M. The human *Loricrin* gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, 1992, p. 18060-18066.

YONEDA, K.; STEINERT, P.M. *Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype.* **Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 90, 1993, p. 10754-10758.**

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0414.0.203.000-09

Interessado(a): Profa. Ana Lúcia Brunialti Godard
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de dezembro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Consolidação do Serviço de Apoio Diagnóstico de Doenças Genéticas para o SUS**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG