

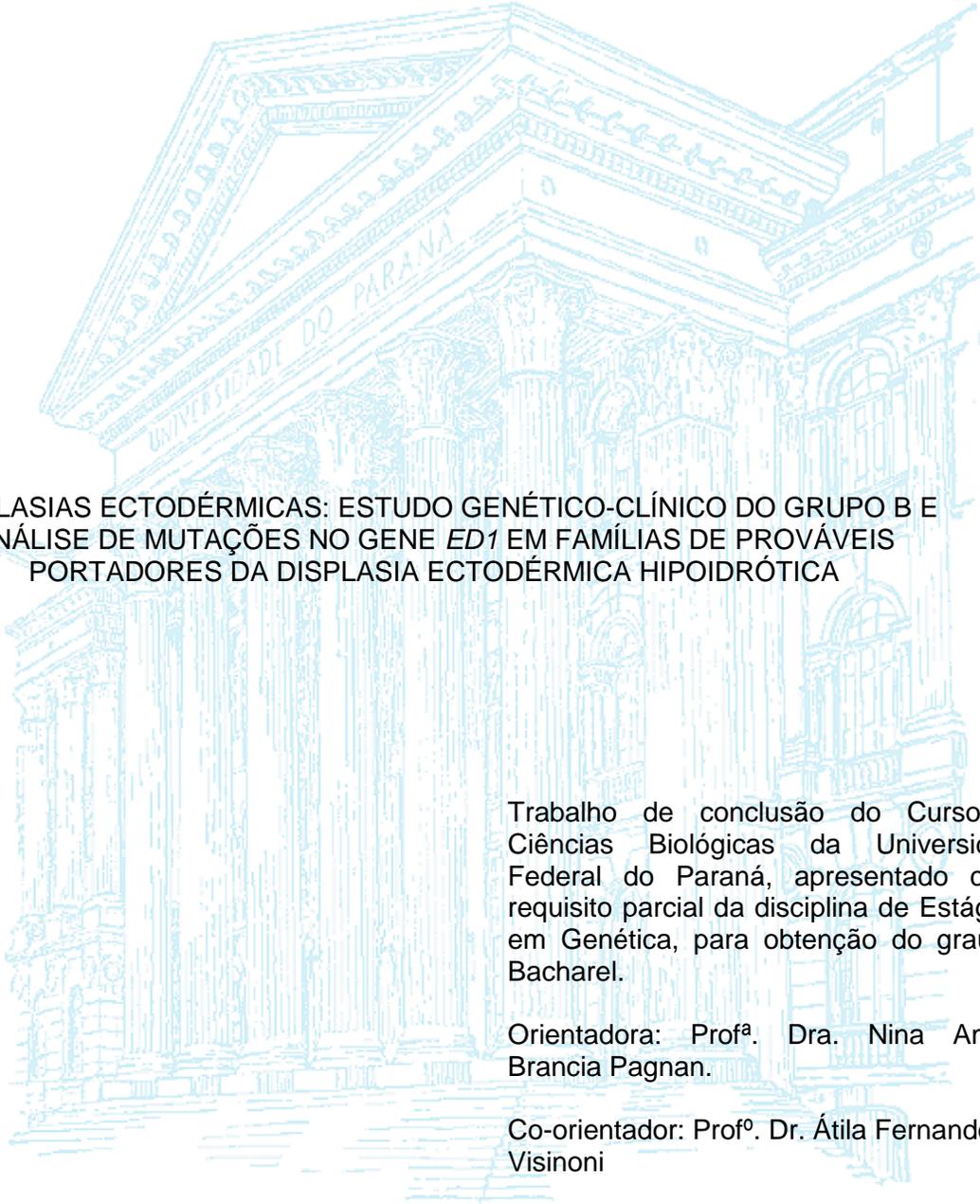
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHACHA BARETTO

DISPLASIAS ECTODÉRMICAS: ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DO GRUPO B E
ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *ED1* EM FAMÍLIAS DE PROVÁVEIS
PORTADORES DA DISPLASIA ECTODÉRMICA HIPOIDRÓTICA

CURITIBA
2011

NATHACHA BARETTO



DISPLASIAS ECTODÉRMICAS: ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DO GRUPO B E
ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *ED1* EM FAMÍLIAS DE PROVÁVEIS
PORTADORES DA DISPLASIA ECTODÉRMICA HIPOIDRÓTICA

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial da disciplina de Estágio II em Genética, para obtenção do grau de Bacharel.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Nina Amália Brancia Pagnan.

Co-orientador: Prof^º. Dr. Átila Fernando Visinoni

CURITIBA
2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, pelo apoio e paciência que tiveram comigo no decorrer destes anos.

Agradeço aos verdadeiros amigos, que me acompanharam nos momentos de alegria e dificuldades.

À Professora Dra. Nina Amália Brancia Pagnan por ter me orientado.

Aos Professores Drs. Átila Fernando Visinoni e Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, por terem me co-orientado e me acolhido no Laboratório de Polimorfismos e Ligação, respectivamente, sempre com muita dedicação.

Agradeço à Professora Dra. Lupe Furtado Alle, integrante do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, assim como todos os colegas de laboratório pela excelente convivência e cooperatividade.

Ao Valter, técnico do Departamento de Bioquímica, pela atenção, apoio e por ter sequenciado as minhas amostras.

E em especial à ajuda da Professora Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia, sempre muito prestativa e atenciosa comigo, desde o início do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	V
RESUMO	VI
INTRODUÇÃO	1
1.1 DISPLASIAS ECTODÉRMICAS.....	1
1.2 DISPLASIA ECTODÉRMICA HIPOIDRÓTICA LIGADA AO CROMOSSOMO X.....	2
1.2.1 <i>Características Clínicas</i>	3
1.2.2 <i>Diagnóstico</i>	4
1.2.3 <i>Tratamento</i>	4
1.3 O GENE <i>ED1</i> E A PROTEÍNA ECTODISPLASINA-A.....	4
1.4 O BANCO DE DADOS INFORMATIZADO SOBRE DISPLASIAS ECTODÉRMICAS.....	9
OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 AMOSTRA.....	11
3.2 METODOLOGIA.....	11
3.2.1 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	12
3.2.2 CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO.....	13
3.2.3 PURIFICAÇÃO DO DNA.....	13
3.2.4 LEITURA NO NANODROP®.....	13
3.2.5 REAÇÃO DE PRÉ-SEQUENCIAMENTO.....	14
3.2.6 PURIFICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO.....	14
3.2.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	15
RESULTADOS	16
4.1 DISPLASIAS ECTODÉRMICAS CLASSIFICADAS.....	16
4.2 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ED1</i> EM SEIS FAMÍLIAS BRASILEIRAS DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE COMO PORTADORAS DE XLHED.....	25
DICUSSÃO	28
5.1 DISPLASIAS ECTODÉRMICAS CLASSIFICADAS.....	28

5.2 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ED1</i> EM SEIS FAMÍLIAS BRASILEIRAS DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE COMO PORTADORAS DE XLHED.....	28
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1 Menino com Displasia Ectodérmica.....	3
Figura 1.2 Desenho esquemático do cromossomo X.....	5
Figura 1.3 Gene <i>ED1</i> e seus transcritos derivados de diferentes processamentos alternativos.....	7
Figura 1.4 Representação esquemática da proteína Ectodisplasina-A	8
Figura 1.5 – Aspecto da página inicial do site www.displasias.ufpr.br	9
Tabela 3.2 Iniciadores usados para a amplificação do gene <i>ED1</i> por PCR.....	12
Quadro 4.1 Principais características da Malformação de mão/pés fendidos tipo 1.....	16
Quadro 4.2 Principais características da Malformação de mão/pés fendidos tipo 3.....	17
Quadro 4.3 Principais características da Malformação de mão/pés fendidos tipo 4.....	18
Quadro 4.4 Principais características da Malformação de mão/pés fendidos tipo 5.....	19
Tabela 4.1 Características ectodérmicas e suas respectivas frequências nos diferentes tipos de SHFM.....	20
Quadro 4.5 Principais características da Síndrome Brachiooculofacial.....	20
Quadro 4.6 Principais características da Síndrome HID.....	21
Quadro 4.7 Principais características da Hipotricose congênita com distrofia macular juvenil.....	22
Quadro 4.8 Principais características da Síndrome do Incisivo Maxilar Central Único.....	23
Quadro 4.9 Principais características da Síndrome de Oliver-MCFarlane.....	24
Figura 4.2 Gel de poliacrilamida, contendo amostras de PCR dos exons 4 e 9 com gradiente de temperatura.....	25
Tabela 4.2 Resultados da análise do sequenciamento do gene <i>ED1</i>	26
Figura 4.3 Eletroferograma das duas fitas de DNA mostrando SNP <i>IVS6-11C>T</i>	27
Figura 4.4 Alinhamento de parte do intron 6 referente ao SNP <i>IVS6-11C>T</i>	27
Figura 4.5 Alinhamento do final do exon 5 referente às variantes <i>IVS5+9C>T</i> e <i>IVS5+11delCT</i>	27

RESUMO

Displasias Ectodérmicas (DEs) são distúrbios caracterizados por alterações em duas ou mais estruturas ectodérmicas, sendo que no mínimo uma dessas alterações ocorre em cabelos/pelos, dentes, unhas ou glândulas sudoríparas. Esse grupo nosológico foi estudado pelo professor Newton Freire-Maia, que elaborou uma classificação baseada em critérios clínicos, subdividindo as displasias em dois grupos chamados de A e B. O grupo A, o maior e o mais estudado, abrange as DEs em que há defeitos em pelo menos duas das seguintes estruturas: pelos; dentes; unhas e sudorese, acompanhadas ou não de malformações. O grupo B inclui as DEs com defeitos em apenas uma dessas quatro estruturas e, pelo menos, um outro defeito ectodérmico. A Displasia Ectodérmica Hipodróica Ligada ao Cromossomo X (XLHED) é a mais comum e se caracteriza, principalmente, por hipodrose grave, hipotricose, hipodontia e oncodisplasia. Seu padrão de herança é recessivo ligado ao X. O gene *ED1* codifica a Ectodisplasina-A, uma proteína transmembrânica pertencente à família do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Mutações no gene *ED1*, que impliquem em alterações da proteína, podem levar ao desenvolvimento da XLHED. Este trabalho tem como objetivos: elaborar uma revisão das displasias do grupo B; manter atualizado o site <http://www.displasias.ufpr.br/> e incluir no site as displasias classificadas como pertencentes ao grupo B; pesquisar mutações no gene *ED1*, determinantes do fenótipo XLHED, em afetados pertencentes a seis famílias, comparando-as com as já descritas na literatura. As técnicas usadas consistiram na amplificação de oito exons do gene *ED1* por PCR, confirmação da amplificação, purificação com as enzimas EXO-SAP, leitura no NanoDrop®, sequenciamento e análise dos resultados. Um SNP, *IVS6-11 C>T*, foi observado em uma família e três variantes de DNA intrônico foram observadas no mesmo indivíduo, *IVS5+9C>T*, *IVS5+11delCT* e *IVS4-18C>T*. Pode-se questionar se estas alterações estão relacionadas com a etiologia dessa DE, por ocorrerem em regiões intrônicas. Entretanto, como mutações intrônicas podem ser funcionais, é possível que este conjunto de mutações se relacione com o fenótipo. Nas demais famílias analisadas não observamos mutações, o que sugere que a mutação responsável pode estar em exons ainda não analisados ou em outro gene. O site sobre DEs foi atualizado, com a adição de informações sobre oitenta e duas displasias do grupo A, inclusive as SHFM 1, 3-5, não classificadas anteriormente como tal. Além disso, foram revisadas onze DEs pertencentes ao grupo B, sendo que quatro destas foram reclassificadas como pertencentes ao grupo A.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1- DISPLASIAS ECTODÉRMICAS

A expressão Displasia Ectodérmica (DE) refere-se a um grande e complexo grupo de distúrbios caracterizados por defeitos do desenvolvimento das estruturas ectodérmicas. DEs, segundo a definição proposta por Freire-Maia (1971, 1977), são distúrbios raros caracterizados por alterações em no mínimo duas estruturas ectodérmicas, sendo que ao menos uma dessas alterações ocorra em cabelos/pelos, dentes, unhas ou glândulas sudoríparas. Seguindo essa definição, Freire-Maia (1971; 1977) dividiu as DEs, com base nos sinais clínicos presentes, em dois grupos (A e B). O grupo A compreende as DEs com alterações em duas ou mais das seguintes estruturas, consideradas como cardinais: cabelos/pelos (1); dentes (2); unhas (3) e glândulas sudoríparas (4). O grupo B inclui as DEs com as alterações em apenas uma das quatro estruturas acima, associada à outra alteração ectodérmica (5).

O Grupo A é dividido em onze subgrupos de acordo com a associação das estruturas envolvidas: 1-2-3-4 (cabelos-dentes-unhas-glândulas sudoríparas); 1-2-3 (cabelos-dentes-unhas); 1-2-4 (cabelos-dentes-glândulas sudoríparas); 1-3-4 (cabelos-unhas-glândulas sudoríparas); 2-3-4 (dentes-unhas-glândulas sudoríparas); 1-2 (cabelos-dentes); 1-3 (cabelos-unhas); 1-4 (cabelos-glândulas sudoríparas); 2-3 (dentes-unhas); 2-4 (dentes-glândulas sudoríparas); 3-4 (unhas-glândulas sudoríparas). Da mesma forma, as afecções pertencentes ao Grupo B são classificadas com o número correspondente à estrutura básica afetada (1, 2, 3 ou 4) seguido do número 5 que indica outros defeitos ectodérmicos. Assim, os distúrbios deste grupo são divididos em quatro subgrupos: 1-5; 2-5; 3-5 e 4-5.

Alterações em outras estruturas de origem ectodérmica podem ocorrer nas DEs. Observam-se alterações em glândulas mamárias, tireóide, timo, medula adrenal, sistema nervoso central, orelha externa, córnea, conjuntiva, glândulas e dutos lacrimais (IRVINE, 2005) e glândulas de Meibomio (KAERCHER, 2004).

Novas classificações foram propostas para as displasias ectodérmicas com base no conhecimento genético ao nível molecular (PRIOLO et al.,2000; PRIOLO e LAGANÀ, 2001; LAMARTINE, 2003; ITIN e FISTAROL, 2004). Essas classificações possuem algumas limitações, pois muitas displasias ectodérmicas ainda não possuem os seus

genes identificados. No entanto, estas classificações baseadas nos aspectos moleculares estão sujeitas a contínuas adições e modificações decorrentes de novas descobertas e permitirão organizar informações que poderão ser usadas em novas pesquisas, tais como o estudo das vias metabólicas e de sinalização embrionária. Por essa razão, esse tipo de classificação é importante para estudos futuros, pois permite explorar o conhecimento sobre a etiologia das DEs que possa levar ao desenvolvimento de procedimentos preventivos e terapêuticos.

Entretanto membros da equipe clínica envolvida com DEs (pediatras, dermatologistas, oftalmologistas, médicos geneticistas, cirurgiões-dentistas, fisioterapeutas e outros profissionais) necessitam, em primeiro lugar, de um método claro e eficiente de diagnóstico quando estão examinando um paciente portador de DE. Apenas em um segundo momento, as informações sobre a etiologia molecular serão utilizadas.

Por esta razão é importante que haja a coexistência de duas diferentes classificações para as DEs. A classificação clínica irá nortear o médico que examina o paciente, permitindo dessa forma um diagnóstico rápido da afecção, enquanto a classificação baseada na etiologia molecular permite a determinação dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

1.2 – DISPLASIA ECTODÉRMICA HIPOIDRÓTICA LIGADA AO CROMOSSOMO X

A Displasia Ectodérmica Hipoidrótica Ligada ao Cromossomo X (XLHED) caracteriza-se, principalmente, por hipoidrose grave, hipotricose, hipodontia e onicodisplasia, pertencendo, portanto, ao grupo A, subgrupo 1-2-3-4 (subgrupo trico-odonto-onico-disidrótico).

Seu padrão de herança é recessivo ligado ao cromossomo X conforme deduziu Thadini em 1921 (apud GOODSHIP et al., 1990), afetando, desta forma, principalmente os indivíduos do sexo masculino. Porém, um estudo realizado por Pinheiro e Freire-Maia (1979) mostrou que 70% das mulheres heterozigotas manifestam uma forma parcial ou branda da síndrome. Para uma mulher apresentar a forma grave dessa displasia, seria necessário que ela fosse homozigota ou que sofresse inativação preferencialmente do cromossomo X que portasse o gene normal (BARTSTRA et al., 1994).

Apesar de ser a mais comum das displasias ectodérmicas, sua incidência é baixa, acometendo um em cada 100.000 indivíduos do sexo masculino (ROCCA E SPADA, 1991; TAPE E TYE, 1995).

A XLHED, cujo nome também pode ser abreviado como XHED, possui vários sinônimos, entre eles, DE Hipodrótica (HED) e Síndrome de Christ-Siemens-Touraine (CST). É também erroneamente chamada de DE Anidrótica, EDA (PINHEIRO E FREIRE-MAIA, 1994). Apesar dessa última denominação não ser apropriada, por se tratar de um distúrbio onde a sudorese está reduzida, e não ausente, essa expressão é muito utilizada na literatura, tendo denominado inclusive o gene responsável por esta afecção: gene *EDA1*. Esse gene também tem sido designado por *EDA* ou *ED1*.

1.2.1- Características Clínicas

Os sinais clínicos mais evidentes da XLHED são hipotricose capilar e corporal, hipodontia e dentes com alterações de forma, hipoidrose com ou sem hipertermia, pele fina e seca (Figura 1.1). Anomalias ungueais são menos freqüentes. O detalhamento das características clínicas dessa DE pode ser encontrado no site <http://www.displasias.ufpr.br>.



Figura 1.1 – Menino com Displasia Ectodérmica. Extraído de Nunn et al. 2003.

1.2.2- Diagnóstico

O diagnóstico de XLHED é feito muitas vezes no primeiro ano de vida quando a criança apresenta febre recorrente de origem desconhecida (Smith, 1993 citado por TAPE E TYE, 1995). A redução da atividade sudorípara resulta em uma intolerância ao calor, inclusive com hipertermia após pequenas atividades físicas. Convulsões devidas à febre podem eventualmente ocorrer devido à incapacidade de transpiração, podendo resultar em danos neurológicos, inclusive retardo mental, se o paciente não receber os cuidados a tempo (TAPE E TYE, 1995).

Zonana et al. (1990) sugeriram o primeiro método de diagnóstico pré-natal, realizado no primeiro trimestre de gestação, baseado em estudo de ligação do gene *ED1* com marcadores moleculares.

1.2.3- Tratamento

O tratamento visa amenizar a sintomatologia, aumentando o conforto e melhorando a auto-estima do paciente. Desta forma, deve-se controlar a temperatura corporal (através do uso de compressas frias, duchas, bebidas geladas e medicamentos); prevenir e tratar cáries dentárias, infecções respiratórias e dermatológicas; monitorar o desenvolvimento da fala e audição.

Pacientes que apresentem hipodontia grave poderão ser submetidos a tratamentos protéticos, a fim de se aumentar a eficiência mastigatória e fonética (CLARKE, 1987; FREIRE-MAIA, 1998). Os pais devem ser orientados sobre a importância da higiene na saúde da criança, principalmente no que se refere à remoção de crostas que se podem formar nas regiões nasal, auricular e genital. À família pode-se oferecer aconselhamento genético e psicológico (CLARKE, 1987; FREIRE-MAIA, 1998).

1.3- O GENE *ED1* E A PROTEÍNA ECTODISPLASIANA-A

Vários trabalhos foram conduzidos, por diferentes autores, para que se pudesse determinar a localização precisa do gene *ED1* no cromossomo X, até que se conseguiu estabelecer que o gene está localizado na região proximal do braço longo do cromossomo X (Xq12-q13.1), (Figura 1.2), 10 cM distal ao marcador DXS1 (KRUSE et al., 1989).

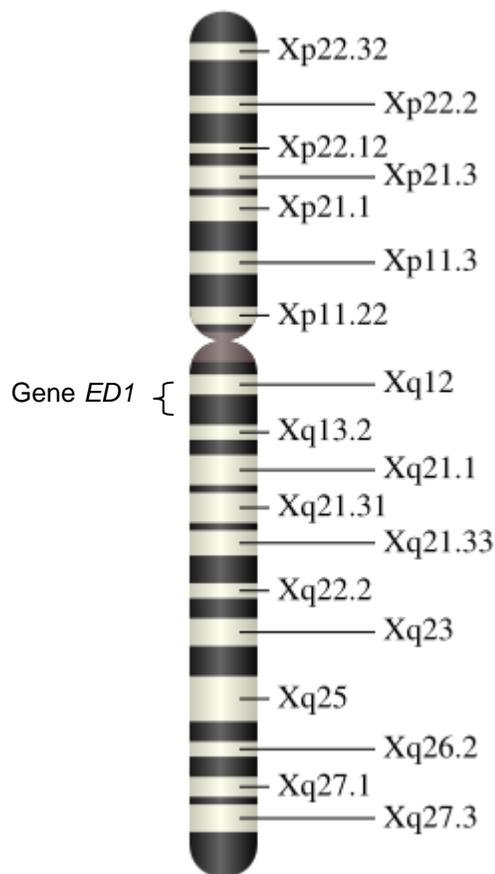


Figura 1.2 - Desenho esquemático do cromossomo X, indicando a posição do gene *ED1*. Adaptado de <http://www.techno-science.net/?onglet=news&news=4878>. Acesso em: 10 jun. 2011.

Srivastava et al. (1997) mostraram que o gene *ED1* codifica uma proteína, por eles chamada de Ectodisplasina-A, que se expressa em dentes em desenvolvimento e na epiderme.

Ferguson et al. (1998) examinaram o DNA de 162 homens afetados e de 21 mulheres com manifestação branda ou certamente portadoras de XLHED. Os dois únicos exons do gene *ED1*, até então conhecidos, foram amplificados e a análise por SSCA mostrou que aproximadamente 7% dos pacientes homens, possuíam mutação no exon 1 e nenhuma variação no outro exon. Dez diferentes mutações supostamente responsáveis pela displasia e quatro prováveis polimorfismos foram identificados.

Bayés et al. (1998) completaram o conhecimento a respeito da estrutura do gene *ED1* e também caracterizaram o transcrito que codifica a proteína Ectodisplasina-A, que possui 391 aminoácidos, é altamente homóloga à proteína de camundongos conhecida como Tabby-A (Ta-A) e possui um pequeno domínio de colágeno. Quatro

novos transcritos, que codificam proteínas truncadas pela ausência do domínio de colágeno, também foram identificados. As formas variantes normais, características de todas as pessoas, mostraram diferentes padrões de expressão em oito tecidos analisados, sugerindo um mecanismo regulatório para a expressão gênica. Os autores determinaram a organização genômica e os limites éxon-íntron do gene *ED1* e observaram que o gene consiste de pelo menos 12 éxons. Entre os éxons 1 (1a e 1b) e 2, na região considerada íntron 1, existem três regiões que podem funcionar como éxons (1c, 1d e 1e). Na realidade, a partir do gene *EDA1*, oito diferentes isoformas da proteína podem ser formadas (Figura 1.3). Todos os transcritos que dão origem às oito isoformas da proteína ectodisplasina conservam o mesmo exon 1a, que codifica um pequeno domínio intracelular (EZER et al., 1999).

A proteína ectodisplasina apresenta um domínio extracelular semelhante ao colágeno, que contém 19 repetições Gly-x-y, com uma única interrupção. Bayés et al (1998) e Scheneider et al (2001) referem que deleções nessa região de repetições não afetam a multimerização e a formação da estrutura em tripla hélice desse domínio da proteína *EDA1*.

Em seu trabalho de mestrado, Visinoni (2002) analisou o gene *ED1* em quatro famílias brasileiras, encontrando mutações em duas delas. Uma das mutações, localizada no exon 5, se tratava da mesma deleção de quatro das repetições Gly-X-Y citada acima. A outra é uma mutação representada pela deleção de uma de duas guaninas (posição 966 ou 967) do exon 6, que resulta na alteração do quadro de leitura e leva a um término precoce da tradução (VISINONI et al., 2003).

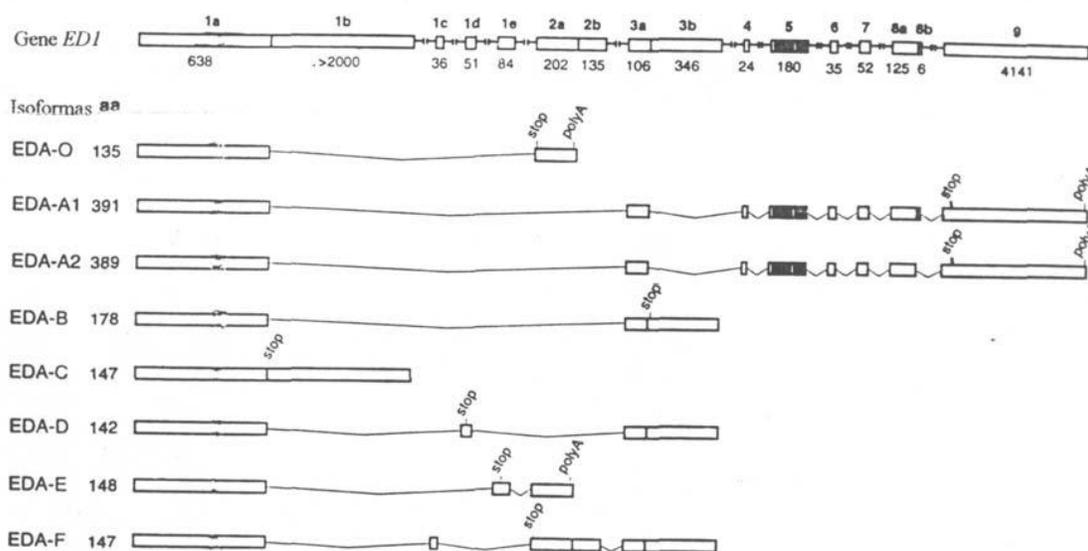


Figura1.3 - Gene *ED1* e seus transcritos com diferentes processamentos alternativos. Os exons são representados por retângulos numerados a partir do final 5' e os seus tamanhos (pb) estão assinalados sob cada um deles. Os retângulos escurecidos representam seqüências que codificam repetições G-X-Y. As posições correspondentes aos códons de terminação (stop) e sinalização de cauda poli-A (polyA) também estão indicadas, bem como, o tamanho, em aminoácidos (aa), de cada isoforma. (Bayés et al. 1998).

A ectodisplasina-A é uma proteína transmembrânica trimérica do tipo II, com um pequeno domínio N-terminal intracelular e uma grande porção C-terminal extracelular e está associada a estruturas do citoesqueleto (BAYES et al., 1998; MONREAL et al., 1998 e YAN et al., 2000). Pertence à família dos ligantes do Fator de Necrose Tumoral (TNF), e sua localização na membrana celular é assimétrica, sendo encontrada nas superfícies lateral e apical das células. Está envolvida no processo de interação epitélio-mesenquimal precoce, que regula a formação de estruturas ectodérmicas (EZER et al., 1999). De todas as formas da ectodisplasina, obtidas por processamento alternativo, apenas as isoformas EDA-A1 e EDA-A2 possuem o domínio extracelular semelhante ao TNF (CHEN et al., 2001) (Figura 1.4).

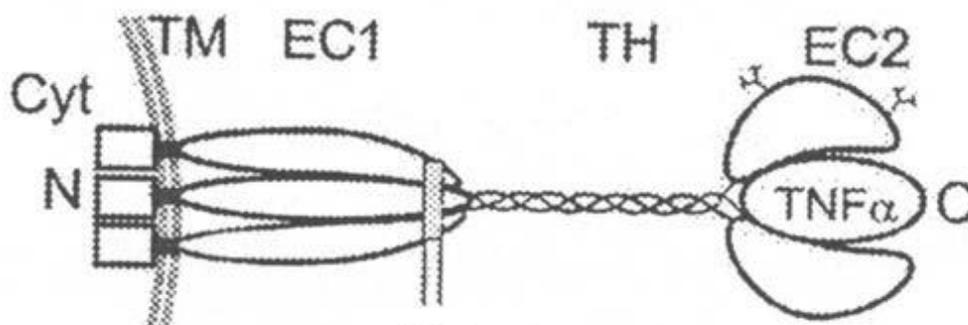


Figura 1.4 – Representação esquemática da proteína Ectodisplina-A. Onde, Cyt: citoplasma; N: região N-terminal; TM: domínio transmembrânico; EC1: primeiro domínio extracelular; TH: domínio triplahélice de colágeno; EC2: segundo domínio extracelular e que contém o motivo semelhante ao TNF; e C: região C-terminal (Chen et al. 2001).

A isoforma EDA-A1 da ectodisplina, com 391 aminoácidos, liga-se especificamente ao receptor EDAR, um membro da família dos receptores de TNF (TNFR) que é codificado pelo gene *EDAR*, localizado no cromossomo 2. Mutações neste gene são responsáveis pelas formas autossômicas dominante e recessiva de displasia ectodérmica hipodrótica, que é clinicamente igual à XLHED. A isoforma EDA-A2, com 389 aminoácidos, se liga a outro receptor da superfamília dos receptores de TNF, o XEDAR. Este receptor é codificado por um gene chamado *XEDAR*, localizado no cromossomo X (YAN et al., 2000; TUCKER, et al., 2000).

A ectodisplina-A é um membro da família de ligantes do TNF, o que sugere que mutações no gene *ED1* poderiam levar a falhas na sinalização requerida para o desenvolvimento normal dos tecidos epiteliais, pois os ligantes TNF produzem sinais que podem levar à proliferação, sinalização ou à apoptose (COSMAN, 1994). A ectodisplina e seu receptor constituem os primeiros membros das famílias do TNF e TNFR, que foram descritos como responsáveis pela regulação da morfogênese embrionária (KOJIMA et al., 2000; LAURIKKALA et al., 2001).

Segundo Montonen et al. (1998), o gene *ED1* inicia sua expressão a partir da oitava semana de gestação, quando a ectodisplina é detectada em células epidérmicas e neuroectodérmicas. Na 12ª semana, a proteína é detectada em osteoblastos e células do timo, enquanto que no folículo piloso sua presença é observada a partir da 18ª semana. Além disso, a ectodisplina também foi detectada em órgãos adultos, tais como glândulas mamárias, folículo piloso e queratinócitos.

1.4 – O BANCO DE DADOS INFORMATIZADO SOBRE DISPLASIAS ECTODÉRMICAS

Em 2001, Lisboa-Costa desenvolveu, em seu trabalho de mestrado, um site disponibilizando informações sobre as Displasias Ectodérmicas (DEs). Com a mudança do sistema operacional dos servidores *Web* da Universidade Federal do Paraná, alguns sites, inclusive o das DEs, não puderam mais ser mantidos na rede mundial de computadores. Isto motivou Visinoni a remodelar o site de DEs, em seu trabalho de Doutorado (2009), com o objetivo de adaptá-lo ao novo sistema operacional, bem como revisar seu conteúdo, e torná-lo novamente disponível na internet. Desta forma foi criado um domínio específico no servidor da UFPR para abrigar o site Displasias Ectodérmicas cujo endereço eletrônico é www.displasias.ufpr.br (Figura 1.5).

O público-alvo do site é formado por profissionais da área da saúde (pediatras, dermatologistas, oftalmologistas, cirurgiões-dentistas, fisioterapeutas, enfermeiros, entre outros), professores e estudantes, famílias com indivíduos acometidos por DE, e pessoas leigas interessadas em aprofundar seu conhecimento sobre o tema. Por sua fácil navegação e sua linguagem simples, embora dentro do rigor científico, as informações contidas no site são acessíveis à população de um modo geral.

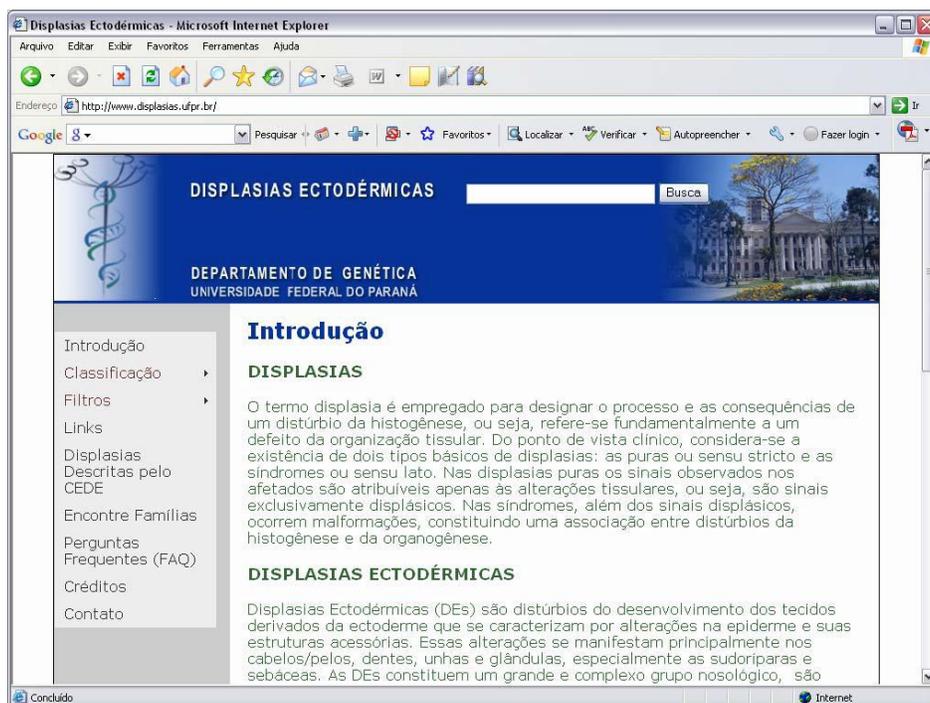


Figura 1.5 – Aspecto da página inicial do site www.displasias.ufpr.br.

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Elaborar uma revisão das displasias ectodérmicas pertencentes aos grupos A e B e pesquisar mutações no gene *ED1* em famílias de portadores da displasia ectodérmica hipodróica.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar uma revisão das displasias ectodérmicas do grupo B.
- Manter atualizado o site <http://www.displasias.ufpr.br/> com dados de displasias ectodérmicas do grupo A
- Incluir no site as displasias classificadas como pertencentes ao grupo B.
- Pesquisar mutações no gene *ED1*, determinantes do fenótipo XLHED, em afetados, pertencentes a seis famílias, comparando-as com as já descritas na literatura.

3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – AMOSTRA

As amostras utilizadas referem-se a seis famílias cujo DNA foi previamente extraído, e encontram-se mantidas refrigeradas a -20°C para a devida conservação.

A família I é residente em Guaratinguetá e Lorena, no estado de São Paulo, apenas um afetado dessa família foi examinado neste trabalho.

A família II reside no estado de São Paulo, sendo composta por quatro pessoas: duas crianças (um menino e uma menina afetados), a mãe e a avó materna. Entretanto, o menino não concordou em doar sangue no momento da coleta e no presente estudo apenas o DNA da irmã do menino foi analisado.

A família III é residente em Itabirinha (MG), sendo composta por cinco pessoas das quais, apenas um menino mostra os sinais da doença.

A família IV é residente em Palhoça (SC), o DNA analisado pertence a uma moça, que apresenta sinais da síndrome.

A família V é residente em Vitória (ES), sendo composta por três pessoas das quais apenas uma menina apresenta sinais da doença.

A família VI reside em Santo André (SP), tendo sido coletado o sangue de apenas um homem, que apresenta sinais da síndrome.

3.2 – METODOLOGIA

As informações sobre as displasias ectodérmicas foram obtidas de periódicos após revisão do PubMed (ADVANCED PUBMED SEARCH – ENTREZ – MEDLINE). Esse sistema de pesquisa, disponível pelo *Entrez Retrieval System* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), foi desenvolvido pelo Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (cujas sigla inglesa é NCBI), nos Estados Unidos, para ser utilizado como ferramenta para levantamento bibliográfico. Utilizamos também o Google Acadêmico para a pesquisa de artigos científicos.

Outros sites que são constantemente atualizados foram utilizados, tais como OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>) e GDB, Genome Database (<http://wehih.wehi.edu.au/gdb/gdbtop.html>).

3.2.1 – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Por esta técnica foram amplificados os éxons 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *ED1*, sendo que para cada exon foram utilizados dois iniciadores específicos (Tabela 3.2). Para a realização da PCR, utilizamos 5pM de cada iniciador, PCR Supermix (Invitrogen – 22 mM Tris HCl pH 8,4; 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 220 μM dATP; 220 μM dTTP; 220 μM dCTP; 220 μM dGTP; 22 U/mL de Taq polimerase) em quantidade suficiente para que o volume total da reação por *ependorf* seja de 10 μl e 1,0 μl do DNA correspondente. As amostras foram colocadas no termociclador (marca Techne), utilizando-se o programa que realiza os seguintes ciclos para a amplificação do DNA: a) 94° C por 1 minuto; b) 94°C por 1 minuto para a desnaturação do DNA; c) temperatura variável, de 50°C até 62°C, por 1 minuto para a hibridização do iniciador; d) 72° C por 1 minuto para a ação da enzima *Taq* polimerase; as etapas b, c e d são repetidas trinta e cinco vezes. Por fim, 72°C por 10 minutos para extensão final.

Com relação às amostras, o DNA já havia sido previamente extraído pelo método de *salting out*. Posteriormente, foram usadas as seguintes técnicas: PCR; eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação; purificação com as enzimas EXO-SAP; leitura no Nanodrop®; reação de sequenciamento e, por fim, purificação da reação de sequenciamento. A seguir estas técnicas serão detalhadas.

Tabela 3.2- Iniciadores usados para a amplificação do gene *ED1* por PCR.

EXON	INICIADOR DIRETO (5' → 3')	INICIADOR REVERSO (5' → 3')	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)
1	GGGTCGGCCGGGACCTCCTC	GCCGCCGCCCTACTAGG	688
3	CAGTGGAGGGGAAGATGGGC	CCACCATGCCCTACCAAGAAGGT	338
4	CCTCAGGAGTCAGAAGAC	ATAACAGACAGACAATGCTG	325
5	ACTACAAATGTAACACTGAGGCC	CACCCACTCCTGCTCTCCTAAAG	582
6	GAAGGTCAGGGCAGGAAACAG	AAAGGTGGCTCTAGCCTGTGG	278
7	CAAGACAGGGGAGAGGGAT	GATTATTTGGAGGCTGGGGAG	254
8	GCCTGGCAGCTGCTTTACAAAC	GCACCGGATCTGCATTCTGG	371
9	AGAACAATGCCTGTCACCTGTCC	TCATGTAAACCCTGGGGCTCC	661

FONTE: Visinoni et al. (2009).

3.2.2 – CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO

A necessidade de confirmação decorre do fato de que as amplificações do DNA podem ser insatisfatórias, devido a uma série de problemas, como imprecisão das micropipetas, pouca concentração de DNA na amostra recebida de DNA já diluído, possível contaminação com DNAses etc. Para isso, foi empregada uma técnica de confirmação da amplificação.

Esta técnica consiste na observação do produto amplificado após eletroforese em gel de agarose 2%. Este gel é preparado com 0,6 g de agarose e 30 ml de tampão TBE 0,5% (54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de EDTA 0,5M e 1L de água destilada), aquecidos em forno microondas. Após a solidificação do gel, aplicam-se 2,0 µl de produto de PCR juntamente com 2,0 µl do corante azul de bromofenol contendo Gel Red (0,2 µl de Gel Red, marca Biotium, em 1ml de corante) e os submete a uma diferença de potencial de 100 volts e a uma corrente elétrica de 30 mA por 45 minutos, para separação do DNA. A visualização das bandas de DNA é feita diretamente sob ação da luz ultravioleta, comparando-as com as bandas de um marcador de peso molecular de DNA, também aplicado no gel.

3.2.3 – PURIFICAÇÃO DO DNA

O produto de PCR é purificado com uso das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I. Nesta técnica, 0,8 µl de exonuclease I, 1,0 µl de fosfatase alcalina de camarão (SAP) e 1,0 µl de água são adicionados aos 8,0 µl restantes de produto de PCR e incubados a 37°C durante uma hora em termociclador. Em seguida, desnaturam-se as enzimas submetendo as amostras a 80°C por 15 minutos no mesmo termociclador.

3.2.4 – LEITURA NO NANODROP

Esta etapa foi adicionada pelo fato de não estarmos tendo sucesso nos sequenciamentos obtidos, uma vez que, para que o sequenciamento ocorra de maneira satisfatória, é necessário que o DNA esteja em uma concentração de 200 a 500 ng/µL. Como a verificação da concentração feita em um gel é, de certa forma, imprecisa, usamos o NanoDrop®, do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, localizado no Departamento de Genética desta Universidade, para aferirmos as concentrações.

Para fazer as medições das concentrações coloca-se 1,0 µL de DNA purificado no aparelho e os valores são gerados no computador, permitindo que se verifique se estão dentro do esperado.

3.2.5 - REAÇÃO DE PRÉ-SEQUENCIAMENTO

Consiste em uma reação de PCR, na qual dideoxi-nucleotídeos são utilizados. Estes são terminadores de cadeia, ou seja, ao serem incorporados na cadeia de DNA, que está sendo produzida pela enzima Taq polimerase, bloqueiam o processo. Dessa forma, cadeias de DNA de diversos tamanhos são formadas, e podemos verificar a posição de cada nucleotídeo após a leitura no sequenciador 3500xL Genetic Analyzer. Na reação utilizam-se: 1,0 µl de Big Dye; 0,5 µl de tampão; 10pM de iniciador; 200 a 500 ng de DNA purificado e água MiliQ em quantidade suficiente para completar 5,0 µl de volume total de reação. A reação em termociclador *Techne* ocorre nas condições: Pré aquecimento a 105°C por quatro minutos; desnaturação inicial a 94°C e trinta e cinco ciclos de: a) 94°C por 30 segundos para a desnaturação do DNA; b) 50°C a 56°C por 45 segundos para a hibridização do iniciador; c) 60°C por 5 minutos e 45 segundos para ação da enzima *Taq* polimerase.

3.2.6 - PURIFICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO

O produto da PCR é purificado para que apenas o DNA seja revelado no sequenciador 3500xL Genetic Analyzer, evitando interferentes na análise. Para tal, acrescentam-se 65 µl de álcool absoluto, 2,0 µl de acetado de amônia 7,5M e 10 µl de água miliQ. A solução é agitada e deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, centrifuga-se a 14 mil rpm por 15 minutos e retira-se o sobrenadante com auxílio de micropipeta. Acrescentam-se 100 µl de álcool a 70% (feito na hora), agita-se e centrifuga-se, novamente, desta vez por 30 minutos. O sobrenadante é dispensado e o líquido restante é evaporado em termociclador a 94°C durante 15 minutos. As amostras são então levadas para sequenciamento em aparelho 3500xL Genetic Analyzer.

3.2.7 – ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para esta etapa são utilizados os programas Bioedit e MEGA 3.1. Por este último é comparada a sequência de nucleotídeos obtida com a sequência do segmento original do éxon que se esperava ter amplificado. As divergências da sequência analisada são confirmadas pelo eletroferograma através do programa Bioedit. Os picos produzidos pelos nucleotídeos são avaliados quanto à altura e qualidade, isto é, observa-se se não há sobreposição com outros picos, devido a ruído de fundo.

4.0 – RESULTADOS

4.1 – DISPLASIAS ECTODÉRMICAS CLASSIFICADAS

O site sobre DEs foi constantemente atualizado com informações sobre oitenta e duas DEs do grupo A e foram revisadas onze DEs supostamente pertencentes ao grupo B. Destas, quatro foram confirmadas no grupo B e sete reclassificadas.

No processo de consulta bibliográfica das displasias ectodérmicas do grupo B, iniciado sempre a partir do banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man*, (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, foram encontradas displasias ectodérmicas que se classificam como do grupo A e que ainda não tinham sido incluídas no site <http://www.displasias.ufpr.br/>.

Entre as displasias ectodérmicas incluídas nesse contexto, temos os quatro tipos de malformação de mãos/pés fendidos (SHFM), que afetam os raios centrais do autópodo, o que origina sindactilia, fissura mediana das mãos e dos pés, aplasia e/ou hipoplasia das falanges, metacarpos e metatarsos.

Os quadros a seguir apresentam características dos diferentes tipos de displasias denominadas malformação de mãos/pés fendidos. Esses quadros foram feitos em um formato que facilita sua inclusão no site das Displasias Ectodérmicas.

Quadro 4.1- Principais características da Malformação de mãos/pés fendidos tipo 1

SUBGRUPO 123			
Título: Malformação de mãos/pés fendidos tipo 1 (SHFM1)			
Sinônimos: Deformidade de mãos/pés fendidos tipo 1; SHFD1; SHSF1; deformidade de mão fendida; ectrodactilia; ECD.			
OMIM:	183600		
Etiologia:	AD	Cromossomo:	7q21.2-21.3
Gene:	<i>SHFM1</i> (?)	Proteína:	Sem dados
Pêlos: Esparsos ou alopecia.			
Dentes: Hipodontia, formato anormal.			
Unhas: Displásicas, distróficas.			
Glândulas sudoríparas: Normais.			
Pele: Normal.			

Audição: Deficiência auditiva geralmente neurossensorial. Alguns pacientes apresentam perda auditiva mista (Ver Comentários).

Olhos: Normais.

Face: Fissura palatina e/ou labial. Micrognatia. Orelhas displásicas e de implantação baixa.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Retardo mental ocasional.

Membros: Malformação do raio central do autópodo, levando à fenda mediana nas mãos e pés; sindactilia, aplasia e/ou hipoplasia das falanges, metacarpianos e metatarsianos. Polidactilia pré-axial e camptodactilia ocasionais.

Outros achados: Defeitos cardíacos congênitos ocasionais.

Comentários: A perda auditiva é usada como critério para a classificação em dois grupos clínicos, SHFM1 e SHFM1D, com audição normal e com perda auditiva, respectivamente.

Quadro 4.2- Principais características da Malformação de mãos/pés fendidos tipo 3

SUBGRUPO 23

Título: Malformação de mãos/pés fendidos tipo 3 (SHFM3)

Sinônimos: SHSF3

OMIM: 600095

Etiologia: AD **Cromossomo:** 10q24

Gene: *BTRC* e *SUFU* (Ver **Proteína:** comentários)

Pêlos: Normais.

Dentes: Malformados ocasionalmente (Ver comentários).

Unhas: Distróficas.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Normal.

Audição: Perda auditiva ocasional.

Olhos: Normais.

Face: Boca e nariz pequenos, orelhas de implantação baixa, malformadas e pequenas, e micrognatia ocasionais.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Retardo mental geralmente grave em cerca de 15% dos casos.

Membros: Malformação do raio central do autópodo, levando à fenda mediana nas mãos e pés; sindactilia, aplasia e/ou hipoplasia das falanges, metacarpianos e metatarsianos (Ver comentários). Polegar trifalângico e de implantação proximal; ausência do primeiro raio, polidactilia pré-axial e camptodactilia nas mãos.

Outros achados: Defeitos cardíacos congênitos e convulsões ocasionais.

Comentários: Lyle et al. (2006) mostraram que os genes *BTR* e *SUFU*, relacionados com a sinalização de beta-catenina, estão super expressos em pacientes com SHFM3. O fato de alterações dentárias serem ocasionais permitiria classificar esta displasia ectodérmica como do grupo B. O envolvimento pré-axial das extremidades superiores é de valor discriminante das SHFM, sendo mais comum em SHFM3 (Elliott et al., 2005).

Quadro 4.3- Principais características da Malformação de mãos/pés fendidos tipo 4

SUBGRUPO 123

Título: Malformação de mãos/pés fendidos tipo 4 (SHFM4)

Sinônimos: Não tem.

OMIM: 605289

Etiologia: AD

Cromossomo: 3q27

Gene: *TP63*

Proteína: Proteína tumoral p63 (semelhante a p73)

Pêlos: Esparsos ou alopecia.

Dentes: Hipodontia, formato anormal.

Unhas: Displásicas, distróficas.

Glândulas sudoríparas: Normais

Pele: Sardas.

Audição: Surdez ocasional, geralmente condutiva.

Olhos: Alterações em dutos lacrimais.

Face: Fissura lábio/palatina.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Retardo mental ocasional.

Membros: Malformação do raio central do autópodo, levando à fenda mediana nas mãos e pés; sindactília; aplasia e/ou hipoplasia das falanges, metacarpianos e metatarsianos; camptodactília rara.

Outros achados: Sem dados.

Comentários: O envolvimento pré-axial dos membros superiores é uma variável discriminante entre as SHFM: SHFM3 (60%), SHFM5 (40%), SHFM4 (4%) e SHFM1 (2%). Revisões sobre SHFM foram publicadas por Elliott et al. (2005) e Elliott e Evans (2006).

Quadro 4.4- Principais características da Malformação de mãos/pés fendidos tipo 5

SUBGRUPO 123

Título: Malformação de mãos/pés fendidos tipo 5 (SHFM5)

Sinônimos: Não tem

OMIM: 606708

Etiologia: AD

Cromossomo: 2q31

Gene: *SHFM5?*

Proteína:

Pêlos: Esparsos ou alopecia.

Dentes: Formato anormal.

Unhas: Displásicas, distróficas.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Normal.

Audição: Normal.

Olhos: Microftalmia.

Face: Nariz e boca pequenos, lábio leporino/palato fendido, micrognatia. Orelhas displásicas e de implantação baixa.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Retardo mental grave.

Membros: Malformação do raio central do autópodo, levando à fenda mediana nas mãos e pés; sindactília, aplasia e/ou hipoplasia das falanges, metacarpianos e metatarsianos; camptodactília. Aproximadamente 5% dos pacientes mostraram polidactília pré-axial.

Outros achados: Retardo de crescimento intra-uterino, baixa estatura, pênis e testículos pequenos e hipospádia. Cardiopatia congênita.

Comentários:

Os sinais ectodérmicos cardinais, que caracterizam as síndromes SHFM1 e 3-5 como displasias ectodérmicas, com a frequência de aparecimento de cada sinal podem ser observados na tabela 4.1.

Tabela 4.1- Características ectodérmicas, com suas respectivas frequências, nos diferentes tipos de SHFM (malformação de mãos/pés fendidos), com base na análise de uma amostra de 150 pacientes, realizada por Elliott et al (2006).

Afeção	Nº OMIM	Cromossomo	Sinais		
			Pelos ¹	Unhas ²	Dentes ³
SHFM1	183600	7q21	12%	6%	18%
SHFM3	600095	10q24	-	24%	3%
SHFM4	605289	3q27	29%	31%	42%
SHFM5	606708	2q31	5%	10%	20%

Nota:¹ Alopecia ou cabelo esparço. ² Displásicas, distróficas, hipoplásicas ou ausentes. ³ Morfologia anormal ou oligodontia.

Além dos quatro tipos de malformação de mãos/pés fendidos (SHFM), há ainda mais uma displasia que foi reclassificada como pertencente ao grupo A: a Síndrome Brachiooculofacial (BOFS). As quatro displasias confirmadas no grupo B foram: Síndrome HID; Hipotricose congênita com distrofia macular juvenil; Síndrome do Incisivo Maxilar Central Único e Síndrome de Oliver-MCFarlane. As duas afeções restantes não foram consideradas como Displasias Ectodérmicas uma vez que não afetam nenhuma das quatro estruturas ectodérmicas cardinais. A seguir podem ser observados os quadros detalhados sobre as DEs.

Quadro 4.5- Principais características da Síndrome Brachiooculofacial

SUBGRUPO 23

Título: Síndrome Brachiooculofacial (BOFS)

Sinônimos: Síndrome BOF

OMIM: 113620

Etiologia: AD

Cromossomo: 6p24

Gene: *TFAP2A*

Proteína:

Pêlos: Normais.

Dentes: Formato anormal.

Unhas: Hipoplásicas.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Normal.

Audição: Perda auditiva condutiva.

Olhos: Telecanto, hipertelorismo, ptose, obstrução dos ductos lacrimais, coloboma da íris, coloboma da retina, microftalmia, anoftalmia, miopia, catarata, estrabismo.

Face: Micrognatia, testa pequena, orelhas de implantação baixa, microtia, nariz largo, septo nasal curto, lábio leporino, palato fendido.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Deficiência de crescimento pré-natal (27%) e pós-natal (50%).

Membros: Normais.

Outros achados: Agenesia renal, polidactilia, clinodactilia, prega palmar transversal única, polegares hipoplásicos.

Comentários:

Quadro 4.6- Principais características da Síndrome HID

SUBGRUPO 15

Título: Ictiose com surdez

Sinônimos: Síndrome HID

OMIM: 602540

Etiologia: AD

Cromossomo: 13q11-q12

Gene: *GJB2*

Proteína: Conexina 26

Pêlos: Alopecia cicatricial, hipotricose de sobrancelhas, pálpebras e couro cabeludo.

Dentes: Normais.

Unhas: Normais.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Ictiose lamelar, manchas eritematosas.

Audição: Surdez neuro sensorial.

Olhos: Normais.

Face: Normal.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Normal.

Membros: Normais.

Outros achados: Propensão a infecções cutâneas bacterianas e micóticas.

Comentários:

Quadro 4.7- Principais características da Hipotricose congênita com distrofia macular juvenil

SUBGRUPO 15

Título: Hipotricose congênita com distrofia macular juvenil

Sinônimos: HJMD

OMIM: 601553

Etiologia: AR

Cromossomo: 16q22.1

Gene: *CDH3*

Proteína: Caderina-3

Pêlos: Hipotricose, alopecia ocasional.

Dentes: Normais.

Unhas: Normais.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Normal.

Audição: Normal.

Olhos: Degeneração macular com ligeira distrofia progressiva da retina periférica.

Face: Normal.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Sem dados.

Membros: Normais.

Outros achados:

Comentários:

Quadro 4.8- Principais características da Síndrome do Incisivo Maxilar Central Único

SUBGRUPO 25**Título:** Síndrome do Incisivo Maxilar Central Único**Sinônimos:** Síndrome SMMCI**OMIM:** 147250**Etiologia:** AD**Cromossomo:** 7q36**Gene:** *SHH***Proteína:****Pêlos:** Normais.**Dentes:** Desenvolvimento anormal da dentição (especificamente os germes do dente incisivo central).**Unhas:** Normais.**Glândulas sudoríparas:** Normais.**Pele:** Normal.**Audição:** Normal.**Olhos:** Hipotelorismo, microcefalia com microftalmia.**Face:** Lábio/palato fendido, atresia coanal, estenose midnasal, nariz achatado, ocasionalmente com uma única narina.**Desenvolvimento psicomotor e de crescimento:** Retardo mental ocasional, baixa estatura, dificuldade de aprendizado, epilepsia.**Membros:** Normais..**Outros achados:** Holoprosencefalia (HPE), deficiência do hormônio do crescimento, deficiência cardíaca congênita.**Comentários:**

Quadro 4.9- Principais características da Síndrome de Oliver-MCFarlane

SUBGRUPO 15

Título: Tricomegalia com retardo mental, nanismo, e degeneração pigmentar da retina

Sinônimos: Síndrome de Oliver-MCFarlane

OMIM: 275400

Etiologia: AR

Cromossomo:

Gene:

Proteína:

Pêlos: Tricomegalia, alopecia frontal.

Dentes: Normais.

Unhas: Normais.

Glândulas sudoríparas: Normais.

Pele: Normal.

Audição: Normal.

Olhos: Nistagmo horizontal, degeneração pigmentar da retina, heterocromia da íris, retinose pigmentar.

Face: Normal.

Desenvolvimento psicomotor e de crescimento: Retardo mental, neuropatia periférica axonal, nanismo.

Membros: Normais.

Outros achados: Deficiência do hormônio do crescimento. Criptorquidismo, pênis subdesenvolvidos, puberdade tardia, abaulamento ossos occipital e frontal fraqueza e perda muscular distal. Hipogonadismo hipogonadotrófico

Comentários:

4.2 – ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *ED1* EM SEIS FAMÍLAS BRASILEIRAS DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE COMO PORTADORAS DE XLHED

Foram examinados 8 exons, do gene *ED1*, pois não se conseguiu amplificar o exon 9 até o presente momento. Foi feita uma PCR com gradiente de temperatura, para verificar a temperatura ideal de hibridização dos iniciadores. Na figura 4.2 é possível observar um gel de poliacrilamida onde se pode verificar que, em um intervalo de 58,5°C a 64,7°C as amostras não amplificaram. Testes com temperaturas mais baixas, entre 48,2°C e 55,8°C, feitos posteriormente, também não mostraram resultados positivos. Estes resultados indicam que o primer pode estar formando estruturas secundárias em grampo, dímeros de um iniciador ou heterodímeros, estruturas que impedem sua hibridização ao DNA e portanto sua amplificação.

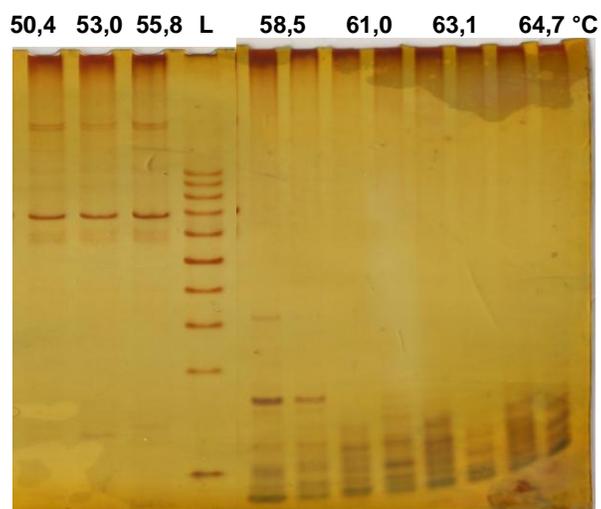


Figura 4.2 – Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, onde se pode observar que nenhuma das oito amostras, testadas com o iniciador do exon 9 em um intervalo de temperatura de 58,5 a 64,7°C, amplificaram. Em comparação, no mesmo gel observam-se três amostras, à esquerda, testadas com o iniciador do exon 4, que amplificaram em três temperaturas diferentes. A letra L- indica o local onde foi aplicado o marcador de peso molecular. Condições da eletroforese: Concentração da poliacrilamida no gel 10%, tempo de corrida 2 horas, V=250, mA=45.

Desta forma, na tabela 4.2, são apresentados os resultados referentes aos exons que já foram analisados e os que ainda estão em análise.

Tabela 4.2 Exons analisados através do sequenciamento do gene *ED1*, responsável pela Displasia Ectodérmica Hipoidrótica Ligada ao Cromossomo X, em afetados de seis famílias.

Exons/Família	I (18)	II (101)	III (131)	IV (161)	V (191)	VI (201)
1a	-	x	-	-	x	x
1b	x	x	x	x	-	-
3	x	x	-	x	-	-
4	x	x	x	x	x	x
5	x	x	x	-	-	-
6	-	-	x	x	-	-
7	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x
9	-	-	-	-	-	-

(x) Exons analisados; (-) Exons ainda em análise.

Um SNP (sigla inglesa para polimorfismo de nucleotídeo único), *IVS6-11 C>T* (rs2296765) já relatado no HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi observado na família II. As figuras 4.3 e 4.4 trazem, respectivamente, o eletroferograma obtido com o sequenciamento e o alinhamento das seqüências do gene *ED1* do indivíduo da família II que possui este SNP.

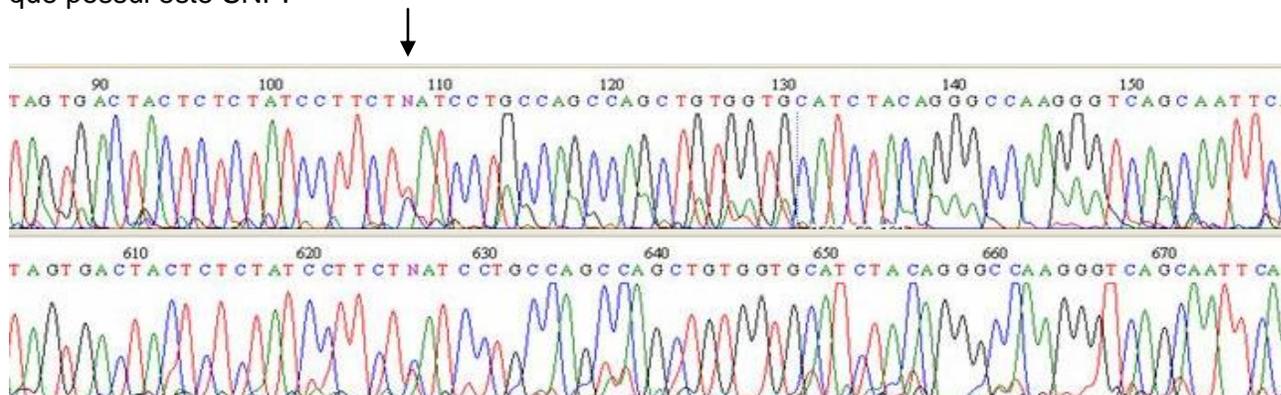


Figura 4.3- Eletroferogramas das duas fitas de DNA da afetada da família II, mostrando o SNP *IVS6-11 C>T* da porção final do intron 6, indicado pela seta.

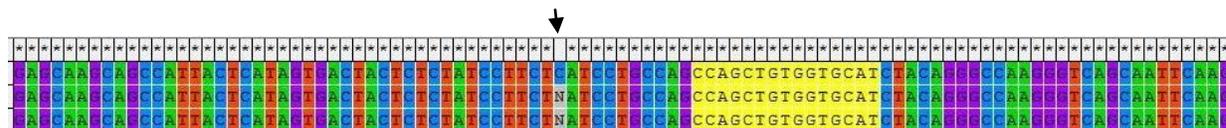


Figura 4.4- Alinhamento de parte do intron 6 com o SNP *IVS6-11 C>T* indicado pela seta, seguido de parte do exon 7. O início do exon 7 encontra-se destacado em amarelo.

As frequências genótípicas deste SNP (rs2296765) são as seguintes: C/C 0.558; C/T 0.204 e T/T 0.239 com base em uma população europeia, tamanho da amostra: 226 cromossomos. Dados extraídos do *Ensembl*.

Três variantes de DNA, *IVS5+9C>T*, *IVS5+11delCT* (Figura 4.5) e *IVS4-18C>T* foram observadas em amostras da mesma afetada da família II.

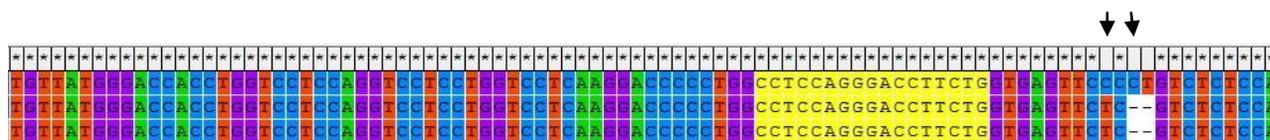


Figura 4.5- Alinhamento do final do exon 5, destacado em amarelo, e parte do intron 5 contendo as variantes *IVS5+9C>T*, *IVS5+11delCT* indicadas pelas setas.

5.0 – DISCUSSÃO

5.1 – DISPLASIAS ECTODÉRMICAS CLASSIFICADAS

Após a revisão, as novas displasias ectodérmicas encontradas foram agrupadas segundo a classificação clínico-mnemônica de FREIRE-MAIA (1971; 1977). Atualmente o site www.displasias.ufpr.br dispunha de informações apenas sobre as displasias do grupo A. Dados sobre as displasias do grupo B e informações inéditas sobre as displasias do grupo A encontrados neste trabalho serão incluídos e servirão para atualizar o site. Além disso, a revisão sobre displasias do grupo B será usada na elaboração de artigo científico para publicação em periódico especializado.

Verificou-se que algumas DEs do grupo A, como as SHFM 1, 3-5, não têm sido classificadas como tal, provavelmente pelo fato das malformações graves de mãos e pés serem mais evidentes que os sinais ectodérmicos. Outra razão pode estar relacionada à frequência dos sinais ectodérmicos, inferior à das malformações ósseas. Entretanto, a frequência com que se observam alterações ectodérmicas é grande o suficiente para que essas afecções sejam incluídas dentre as displasias ectodérmicas.

5.2 – ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *ED1* EM SEIS FAMÍLIAS BRASILEIRAS DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE COMO PORTADORAS DE XLHED

Foram analisados oito exons do gene *ED1* de indivíduos diagnosticados clinicamente com displasia ectodérmica. Entretanto, devido à ocorrência de dificuldades técnicas, nem todas as amostras puderam ser completamente analisadas. Dentre estas, pode-se citar a dificuldade em amplificar o exon 9, mesmo com a compra de novos iniciadores, ainda não se conseguiu determinar uma temperatura adequada para que ocorra a amplificação. Outro exon que causou certa dificuldade de amplificação (devido ao seu extenso tamanho) foi o exon 1. Para contornar esse problema optou-se pelo exame desse exon em dois fragmentos (a, b).

Os fragmentos analisados compreendiam, além dos exons, cerca de 100 nucleotídeos pertencentes a cada extremidade dos introns que os ladeiam. Esta estratégia permitiu a detecção do SNP já descrito (*IVS6-11 C>T*) e das três variantes (*IVS5+9C>T*, *IVS5+11delCT* e *IVS4-18C>T*) sobre as quais não encontramos relato. Como essas três

variantes não estão relatadas no HapMap, consideramos que não sejam relativamente frequentes, isto é, não se tratam de SNPs. Sabe-se que mutações em regiões intrônicas, neste caso introns 4 e 5, podem causar distúrbios e como o mesmo indivíduo apresenta três variantes em regiões intrônicas, muito próximas ao início ou final de exon é possível que sejam responsáveis por essa patologia. Esta hipótese se fortalece pelo fato dessas variantes se encontrarem muito próximas ao exon 5 que é um exon que codifica domínios essenciais para o funcionamento da proteína Ectodisplasina-A e, segundo Visinoni (2009), é um exon que apresenta o maior número de mutações, juntamente com os exons 7 e 9, este último ainda não analisado. Isto pode ser explicado pelo fato do exon 5 ser o responsável pela codificação completa do subdomínio de colágeno, essencial para a trimerização da proteína, os exons 7, 8 e 9 responsáveis pelo subdomínio semelhante ao TNF, que representa a porção da proteína que se liga ao receptor EDAR.

Portanto a mutação responsável pela DE, não se encontra exons 4, 7 e 8 de todas as famílias, uma vez que estes foram completamente analisados e não foi encontrada nenhuma discrepância que pudesse indicar mutação.

Ainda faltam três exons para serem analisados nas famílias I, III e IV nos quais poderá ser encontrada a mutação. Já com relação às famílias V e VI por se tratarem de amostras coletadas recentemente, faltam cinco exons para serem analisados. Além disso, é necessário ter muito cuidado ao se analisar as amostras pertencentes às famílias IV e V, uma vez que as afetadas são mulheres e a análise requer maior cautela, visto que mulheres possuem dois cromossomos X, dessa forma há dois picos de fluorescência já que ocorre a amplificação de ambos cromossomos durante a PCR, sendo que apenas um deles conteria a mutação. No entanto, se não forem encontrados resultados positivos para estas famílias, será descartada a XLHED como causa dos sinais apresentados por esses pacientes e poderá, então, suspeitar-se da forma autossômica da DE, pois esta última pode apresentar os mesmos sinais que a XLHED, sendo de ocorrência ainda mais rara.

6.0 – CONCLUSÕES

6.1 Sete DEs classificadas anteriormente como do grupo B, foram classificadas como pertencentes ao grupo A e quatro permaneceram confirmadas no grupo B.

6.2 Um SNP, *IVS6-11 C>T* já relatado no HapMap, foi observado na família II. Nessa mesma família, três outras variantes de DNA intrônico, *IVS5+9C>T*, *IVS5+11delCT* e *IVS4-18C>T*, também foram observadas. Entretanto, apesar de parecer improvável, mutações em regiões intrônicas podem estar relacionadas a distúrbios. Como as três variantes se encontram no mesmo indivíduo, é possível que este conjunto de mutações seja responsável pelo fenótipo XLHED. Não há relatos prévios da observação dessas mutações em pacientes com essa displasia, isoladas ou associadas. Nosso achado é, portanto, o primeiro da literatura.

6.3 Das demais famílias analisadas, até o presente momento, nenhuma apresentou mutação compatível com a XLHED. Neste caso, podem-se considerar duas possibilidades. Na primeira hipótese, a mutação responsável pela DE pode estar em exons ainda não analisados. Já na segunda hipótese, se não forem encontradas tais mutações, a suspeita será de mutação em gene autossômico associado ao mesmo fenótipo. Portanto, novos estudos deverão ser feitos, dando continuidade a este trabalho.

7.0- REFERÊNCIAS

BARTSTRA, H.L.J.; HULSMANS, R.F.H.J.; STEIJLEN, P.M.; RUIGE, M.; DIESMULDERS, C.E.M.; CASSIMAN, J.J. Mosaic expression of hypohidrotic ectodermal dysplasia in an affected female child. **Arch. Dermatol.**, v. 130, p. 1421-1424, 1994.

BAYÉS, M.; HARTUNG, A.J.; EZER, S.; PISPA, J.; THESLEFF, I.; SRIVASTAVA, A.K.; KERE, J. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7, n. 11, p. 1661-1669, 1998.

CHEN, Y.; MOLLOY, S.S.; THOMAS, L.; GAMBEE, J.; BÄCHINGER, H.P.; FERGUSON, B.; ZONANA, J.; THOMAS, G.; MORRIS, N.P. Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 13, p. 7218-7223, 2001.

CLARKE, A. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. **J. Med. Genet.**, v. 24, p. 659-663, 1987.

COSMAN, D. A family of ligands for the TNF receptor superfamily. **Stem Cells**, v. 12, p. 440-455, 1994.

EZER, S.; BAYÉS, M.; ELOMAA, O.; SCHLESSINGER, D.; KERE, J. Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells. **Hum. Mol. Genet.**, v. 8, p. 2079-2086, 1999.

FERGUSON, B.M.; THOMAS, N.S.T.; MUNOZ, F.; MORGAN, D.; CLARKE, A.; ZONANA, J. Scarcity of mutations detected in families with X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: diagnostic implications. **J. Med. Genet.**, v. 35, p. 112-115, 1998.

FREIRE-MAIA, N. Ectodermal dysplasias. **Hum. Hered.**, v. 21, p. 309-312, 1971.

_____. Ectodermal dysplasias revisited. **Acta Genet. Med. Gemellol.**, v. 26, p. 121-131, 1977.

_____. **Displasias ectodérmicas**: o que são, suas causas, como conviver com elas, onde procurar aconselhamento genético. Curitiba: Gráfica Mileart, 1998.

GOODSHIP, J.; MALCOLM, S.; CLARKE, A.; PEMBREY, M.E. Possible genetic heterogeneity in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. **Journal of Medical Genetics**, London, v.27, p. 422-425, 1990.

IRVINE, A. D. Ectodermal dysplasias. In: HARPER, J. I.; ORANJE, O. P.; PROSE, N. **Pediatric dermatology**, 2ed. Oxford: Blackwell Scientific, 2005. p. 1412-1466.

ITIN, P. H.; FISTAROL, S. K. Ectodermal dysplasias. **Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.** v. 131C, p. 45-51, 2004.

KAERCHER, T. Ocular symptoms and signs in patients with ectodermal dysplasia syndromes. **Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 242, p. 495-500, 2004.

KOJIMA, T.; MORIKAWA, Y.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; SENBA, E.; KITAMURA, T. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 27, p. 20742-20747, 2000.

KRUSE, T.A.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; KAITILA, I.; SODERHOLM, A.L.; DE LA CHAPELLE, A.; MACDERMOT, K.D. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (EDA): multipoint linkage analysis. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 51, p. 1026, 1989.

LAMARTINE, J. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 28, p. 351-355, 2003.

LAURIKKALA, J.; MIKKOLA, M.; MUSTONEN, T.; ABERG, T.; KOPPINEN, P.; PISPA, J.; NIEMINEN, P.; GALCERAN, J.; GROSSCHEDL, R.; THESLEFF, I. TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling center and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. **Dev. Biol.**, v. 229, p. 443-455, 2001.

MONREAL, A.W.; ZONANA, J.; FERGUSON, B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 63, p. 380-389, 1998.

MONTONEN, O.; EZER, S.; SAARILHO-KERE, U.K.; HERVA, R.; KARJALAINENLINDSBERG, M.L.; KAITILA, I.; SCHLESSINGER, D.; SRIVASTAVA, A.K.; THESLEFF, I.; KERE, J. The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and bone. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 46, n. 3, p. 281-289, 1998.

PINHEIRO, M.; FREIRE-MAIA, N. Christ-Siemens-Touraine syndrome - a clinical and genetic analysis of a large Brazilian kindred: I. Affected females. II. Affected males. III. Carrier detection. **Am. J. Med. Genet.**, v. 4, p. 113-134, 1979.

_____. Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. **Am. J. Med. Genet.**, v. 53, p. 153-162, 1994.

PRIOLO, M.; LAGANÀ, C. Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification. **J. Med. Genet.**, v. 38, p. 579-585, 2001.

PRIOLO, M.; SILENGO, M.; LERONE, M.; RAVAZZOLO, R. Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep. **Clin. Genet.**, v. 58, p. 415-430, 2000.

ROCCA, M.; SPADA, M. La displasia ectodermica anidrotica (DEA) o síndrome di Christ- Siemens-Touraine - contributo casistico. **Minerva Pediatr.**, v. 43, n. 7-8, p. 517-520, 1991.

SMITH, R. A.; VARGERVIK, K.; KEARNS, G.; BOSCH, C.; KOUMJIAN, J. Placement of an endosseous implant in a growing child with ectodermal dysplasia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 75, p. 669-673, 1993.

SRIVASTAVA, A.K.; PISPA, J.; HARTUNG, A.J.; DU, Y.; EZER, S.; JENKS, T.; SHIMADA, T.; PEKKANEN, M.; MIKKOLA, M.L.; KO, M.S.H.; THESLEFF, I.; KERE, J.; SCHLESSINGER, D. The Tabby Fnotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin- A) with collagenous domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, p. 13069-13074, 1997.

TAPE, M.W.; TYE, E. Ectodermal dysplasia: literature review and a case report. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 16, p. 524-529, 1995.

TUCKER, A.S.; HEADON, D.J.; SCHNEIDER, P.; FERGUSON, B.M.; OVERBEEK, P.; TSCHOPP, J.; SHARPE, P.T. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. **Development (Cambridge)**, v. 127, p. 4691-4700, 2000.

VINCENT, M.C.; BIANCALANA, V.; GINISTY, D.; MANDEL, J.L.; CALVAS, P. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 9, n. 5, p. 355-363, 2001.

VISINONI, A.F. **DISPLASIAS ECTODÉRMICAS – REVISÃO DO GRUPO A, –** Atualização de banco de dados informatizado e análise de variantes do gene *ED1*. Curitiba, 2009. 123 f. Dissertação (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____. **Displasia ectodérmica hipodrótica ligada ao cromossomo X** – Estudo molecular do gene *ED1* em quatro famílias brasileiras. Curitiba, 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VISINONI, A.F.; DE SOUZA, R.L.R.; FREIRE-MAIA, N.; GOLLOP, T.R.; CHAUTARDFREIRE-MAIA, E.A. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations in Brazilian families. **Am. J. Med. Genet**, v. 122A, p. 51-55, 2003.

YAN, M.; WANG, L.C.; HYMOWITZ, S.G.; SCHILBACH, S.; LEE, J.; GODDARD, A.; VOS, A.M.; GAO, W.Q.; DIXIT, V.M. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. **Science (Washington DC)**, v. 290, p. 523-527, 2000.

ZONANA, J.; SHINZEL, A.; UPADHYAYA, M.; THOMAS, N.S.T.; ANTON-LAMPRECHT, I.; HARPER, P.S. Prenatal diagnosis of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia by linkage analysis. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v. 35, p. 132-135, 1990.