

FABIANA ALEXANDRINO

**ESTUDO MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS EM
DISTÚRBIOS DE QUERATINIZAÇÃO E PERDA AUDITIVA**

CAMPINAS

Unicamp

2008

FABIANA ALEXANDRINO

**ESTUDO MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS EM
DISTÚRBIOS DE QUERATINIZAÇÃO E PERDA AUDITIVA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

Al27e Alexandrino, Fabiana
Estudo molecular de genes envolvidos em distúrbios de
queratinização e perda auditiva. / Fabiana Alexandrino. Campinas, SP
: [s.n.], 2008.

Orientador : Edi Lucia Sartorato
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Perda auditiva. 2. Audição (Fisiologia). 3. Pele Doenças.
I. Sartorato, Edi Lucia. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Molecular study in keratinization disturb and hearing loss
genes**

Keywords: . **Connexin gene**
. **Deafness (Physiology)**
. **Skin diseases**

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação:Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profª. Drª. Edi Lucia Sartorato

Profº. Drº. Rui Piloto

Profº. Drº. João Monteiro de Pina Neto

Profº. Drº. Andréa Trevas Maciel-Guerra

Profª. Drª. Mônica Barbosa de Melo

Data da defesa: 22-02-2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Fabiana Alexandrino

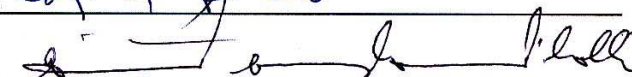
Orientador: Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato

Membros:

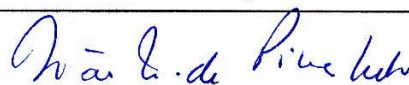
1. Prof. Dr. Edi Lucia Sartorato -



2. Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto -



3. Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto -



4. Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra -



5. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo -



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

Data: 22/02/2008

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço em primeiro lugar meus pais, José e Marília, pelo amor, incentivo e confiança. Essa minha conquista é para vocês, que sempre confiaram em mim e me ensinaram a ser quem eu sou.

A Mari e ao Carlos que torcem muito por mim e com quem sempre posso contar. Essa conquista também é para vocês que me acompanharam e apoiaram desde o início. Obrigada pela confiança e paciência.

Ao João, meu pequeno grande amor, que chegou para iluminar nossas vidas.

A Fernanda, minha amiga de coração, quem participou ativamente de todos os momentos do meu trabalho. Para ter um amigo de verdade requer paciência, é necessário que a conquista seja com destreza, vontade, encanto, carinho e sinceridade. Tirando a paciência, você é uma pessoa incomparável e admirável, obrigada pelo carinho!

A Madá por sua experiência técnica e principalmente de vida, sua alegria contagiante sempre iluminou todos nós nesse laboratório. Madá, no final deste trabalho você não estava mais aqui, mas a sua participação foi muito importante, nunca vou me esquecer de você.

Ao Daniel, meu filho, por estar sempre disposto a me ajudar apesar dos porquês. Agradeço por sua competência, dedicação e principalmente pela amizade. Adorei trabalhar com você.

Às amigas Bruna e Vanessa, pela admiração, respeito e diversão, afinal quem não se diverte com alegria da Van, e a pequena Dani pelo carinho. Vocês são muito especiais!

A Thalita pela torcida e carinho e a Fer Coeli pela cumplicidade e respeito. Obrigada pela participação!

A todo pessoal do laboratório de Genética Humana pela convivência, respeito e paciência: Sueli, Jessica, Paula, Flávia Leme, Fer Soardi, Francine, Renan, Zélo, Reginaldo, Paulo, Carol.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edi pela orientação desde a capacitação técnica. Agradeço sua paciência, confiança e principalmente a amizade e preocupação que você tem com todos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Elemir M. de Souza e a Dra. Renata F. Magalhães, pela indispensável colaboração e pela triagem dos pacientes avaliados nesse trabalho.

À Profa. Dra. Camila Andréa de Oliveira pelo início deste trabalho e principalmente pela amizade.

À Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra pelas sugestões na pré-banca e participação na banca examinadora desta tese.

Ao Prof. Dr. Rui Pilotto e ao Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto por aceitarem participar da banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo pela contribuição e participação na banca examinadora do exame de qualificação, pré-banca e banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Cláudia Viana Maurer Morelli por participar da pré-banca desta tese, bem como pelo auxílio no desenvolvimento de novos projetos.

Ao Prof. Dr. Maurício Kurc por aceitar participar da banca examinadora da tese.

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello pelo apoio científico e amizade em todos esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner pela sua indispensável colaboração na avaliação de alguns pacientes da casuística desta tese, bem como pela sua participação na banca examinadora do exame de qualificação e por sua total disposição no desenvolvimento de diversos trabalhos.

Aos funcionários do CBMEG, principalmente a Sandra e a Tânia, pela disposição em nos ajudar.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Portanto, o valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Pessoa)

	PÁG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
INTRODUÇÃO	43
1- Conexinas	45
1.1- Estrutura e Fisiologia.....	45
1.2- Aspectos Moleculares.....	47
2- Alterações Dermatológicas	49
3- Alterações em genes conexinas associadas a diferentes fenótipos	51
3.1- Gene <i>GJB2</i> (Cx26).....	51
3.1.1- Ceratodermia Palmoplantar (PPK) associada à perda auditiva.....	52
3.1.2- Síndrome Vohwinkel (SV).....	53
3.1.3- Síndrome KID.....	54
3.1.4- Outros distúrbios relacionados a mutações dominantes no gene <i>GJB2</i>	55
3.2- Gene <i>GJB6</i> (Cx30).....	57
3.2.1- Displasia Ectodérmica Hidrótica (HED).....	57
3.3- Gene <i>GJB3</i> (Cx31).....	58
3.3.1- Eritroceratodermia <i>variabilis</i> (EKV).....	58
3.4- Gene <i>GJA1</i> (Cx43).....	59

3.4.1- Displasia Oculodentodigital (ODDD).....	60
3.5- Gene <i>GJB4</i> (Cx30.3).....	60
3.6- Gene <i>GJB5</i> (Cx 31.1).....	61
4- Distúrbios de Queratinização e Conexinas.....	61
5- Distúrbios de Queratinização associados à mutação mitocondrial	62
OBJETIVOS.....	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
1- Casuística	69
2- Estratégia de Análise	72
3- Métodos	72
3.1- Extração de DNA genômico.....	72
3.2- Detecção das deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	73
3.3- Rastreamento da mutação A7445G no gene tRNA ^{Ser(UCN)}	74
3.4- Amplificação dos genes conexinas.....	75
3.4.1- Gene <i>GJB2</i> (Cx26).....	76
3.4.2- Gene <i>GJB6</i> (Cx30).....	77
3.4.3- Gene <i>GJB3</i> (Cx31).....	77
3.4.4- Gene <i>GJA1</i> (Cx43).....	78
3.4.5- Gene <i>GJB4</i> (Cx30.3).....	78
3.4.6- Gene <i>GJB5</i> (Cx31.1).....	79
3.5- Seqüenciamento Automático.....	79
3.6- Confirmação de mutações.....	80

RESULTADOS.....	81
Estudo da mutação A7445G e das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$	83
Estudo molecular dos genes conexinas.....	85
DISCUSSÃO.....	97
Paciente 1.....	100
Paciente 2.....	102
Paciente 3.....	103
Paciente 4.....	103
Paciente 5.....	105
Paciente 6.....	106
Paciente 7.....	108
Paciente 8.....	108
Paciente 9.....	108
Paciente 10.....	112
Paciente 11.....	112
Paciente 12.....	113
Paciente 13.....	114
Paciente 14.....	115
Paciente 15.....	115
CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

ANEXOS.....	133
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	135
Anexo 2- Parecer Comitê Ética – CEP.....	138
Anexo 3- Parecer Comitê Ética para alteração de pesquisador – CEP.....	140
Anexo 4- Artigo Publicado.....	141
Anexo 5- Artigo Submetido.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
dNTPs	Desoxinucleotídeos
del	deleção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F	<i>Forward</i>
Kb	quilobase
KDa	quilodalton
mM	milimolar
M	Molar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	picomol
PSA	persulfato de amônia
R	<i>Reverse</i>
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TA	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)- aminometano
U	unidade

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Genes conexinas e sua expressão.....	48
Tabela 2- Relação dos pacientes estudados na casuística do trabalho.....	70
Tabela 3- Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação da região do gene tRNA ^{Ser(UCN)}	75
Tabela 4- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJB2</i> ...	76
Tabela 5- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJB6</i> ...	77
Tabela 6- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJB3</i> ...	77
Tabela 7- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJA1</i> ...	78
Tabela 8- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJB4</i> ...	78
Tabela 9- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>GJB5</i> ...	79
Tabela 10- Genótipos relacionados aos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> , <i>GJB3</i> , <i>GJA1</i> , <i>GJB4</i> e <i>GJB5</i>	85
Tabela 11- Resumo dos resultados da família 9.....	111

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Permeabilidade dos canais <i>gap junctions</i> : (A) transporte de pequenas moléculas, (B) pequenas moléculas com formas alongadas e (C) uma combinação de ambas as moléculas..	45
Figura 2- Possíveis arranjos de conéxons para formar canais <i>gap junctions</i>	46
Figura 3- Estrutura de conexinas.....	47
Figura 4- Localização dos genes conexinas nos cromossomos humanos.....	48
Figura 5- Localização de diferentes mutações dominantes no gene <i>GJB2</i> no primeiro domínio extracelular, mostrando a conservação desta região em diferentes espécies.....	56
Figura 6- Estratégia para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1830)$	74
Figura 7- Programa de PCR do gene tRNA ^{Ser(UCN)}	75
Figura 8- Programa de PCR para amplificação dos genes conexinas.....	76
Figura 9- Programa utilizado na reação de seqüenciamento automático.....	79
Figura 10- Resultado da análise de restrição da mutação A7445G. A- (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (1-15) PCR dos pacientes. B- (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (1-15) PCR digerido.....	83

Figura 11-	Resultado da análise das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene <i>GJB6</i> . (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (C ₁ -C ₂) controles, (1-15) PCR dos pacientes.....	84
Figura 12-	Esquema dos domínios estruturais dos genes conexinas e localização das mutações encontradas.....	86
Figura 13-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB2</i> : A- seqüência normal; B- paciente 1 heterozigoto para a mutação G59S ($G^{175} \rightarrow A$).....	87
Figura 14-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB4</i> : A- seqüência normal; B- paciente 1 heterozigoto para a mutação E204A ($A^{610} \rightarrow C$).....	88
Figura 15-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB2</i> : A- seqüência normal; B- paciente 4 heterozigoto para a mutação R75Q ($G^{224} \rightarrow A$).....	89
Figura 16-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJA1</i> : A- seqüência normal; B- paciente 06 heterozigoto para o SNP A253V ($C^{757} \rightarrow T$).....	90
Figura 17-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB4</i> : A- seqüência normal; B- paciente 07 heterozigoto para a mutação R151S ($C^{451} \rightarrow A$).....	91
Figura 18-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB2</i> : A- seqüência normal; B- paciente 9 heterozigoto para as alterações V27I ($G^{79} \rightarrow A$) e V37I ($G^{109} \rightarrow A$).....	92
Figura 19-	Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB3</i> : A- seqüência normal; B- paciente 9 heterozigoto para a mutação R32W ($C^{94} \rightarrow T$).....	93

Figura 20-	Eletoferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB4</i> : A- seqüência normal; B- paciente 9 heterozigoto para a mutação 154del4 (GTCT), fita sense; C- paciente 9 heterozigoto para a mutação 154del4 (GTCT), fita antisense.....	94
Figura 21-	Eletoferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB3</i> : A- seqüência normal; B- paciente 11 heterozigoto para a mutação V200I ($G^{1731} \rightarrow A$).....	95
Figura 22-	Eletoferograma mostrando parte da seqüência do gene <i>GJB2</i> : A- seqüência normal; B- paciente 14 heterozigoto para a mutação K168R ($A^{503} \rightarrow G$).....	96
Figura 23-	Esquema dos domínios estruturais dos genes conexinas e localização das mutações encontradas no paciente 1.....	101
Figura 24-	Esquema dos domínios estruturais do gene <i>GJB2</i> (Cx26) e localização da mutação das mutações R75Q e R75W.....	105
Figura 25-	Localização das diferentes mutações nos genes conexinas encontradas no paciente 9.....	110
Figura 26-	Heredograma da família 9.....	112

RESUMO



Nos organismos superiores, a comunicação entre as células ocorre através de proteínas denominadas conexinas, implicadas na comunicação intercelular (*gap junction*), as quais permitem a transferência direta de pequenas moléculas e íons. Na pele desempenham um papel crucial na sinalização e diferenciação epidérmica. Na cóclea as *gap junctions* existem entre as células de suporte das células ciliadas, formando um caminho para a reciclagem dos íons K^+ , envolvidos na transdução da audição. A multiplicidade de funções exercidas pelas *gap junctions* é refletida pela variedade de fenótipos causados por mutações em genes de conexinas. A combinação da perda auditiva, distúrbio congênito da diferenciação celular das camadas da epiderme, e envolvimento de tecidos ectodérmicos, reflete o papel crucial das conexinas na diferenciação epitelial e na transdução auditiva. Dessa forma, frente a um indivíduo com distúrbios de queratinização associada ou não a perda auditiva propõe-se à investigação molecular de conexinas que se expressam na cóclea e epiderme, como as conexinas 26, 30, 31, 43, 30.3 e 31.1.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo a análise molecular dos genes *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30), *GJB3* (Cx31), *GJA1* (Cx43), *GJB4* (Cx30.3) e *GJB5* (Cx31.1), bem como a triagem das deleções Δ (*GJB6*-D13S1830) e Δ (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* e da mutação mitocondrial A7445G no gene tRNA^{Ser(UCN)}. As metodologias empregadas para avaliação molecular dos pacientes foram o seqüenciamento automático dos produtos de PCR dos genes conexinas, PCR multiplex para detecção das deleções e análise de restrição do produto de PCR do DNA mitocondrial.

Nos resultados foram observados dois casos com mutações autossômicas dominantes no gene *GJB2* e um paciente com herança digênica, com mutações nos genes *GJB2* e *GJB3*. Outras alterações foram observadas nos demais pacientes, algumas descritas como polimorfismos freqüentes na população normal, ou ainda outras alterações com funções desconhecidas.

ABSTRACT

The connexins are family proteins whose major function is as part of the gap junctions of cell-to-cell channels. They are expressed in several tissues including brain, skin, and cochlea. Mutations in connexins genes play a major role in nonsyndromic deafness, but have been also described in individuals with variable dermatological features.

In recent years, many genes responsible for hereditary skin diseases have been discovered. These genes may encode different proteins that participate in the terminal differentiation of the epidermis. Therefore alteration or absence of these proteins causes a keratinization disorder. It has been demonstrated that distinct germline mutations within six connexin (Cx) genes *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30), *GJB3* (Cx31), *GJA1* (Cx43), *GJB4* (Cx30.3), and *GJB5* (Cx31.1), may cause sensorineural hearing loss and various skin disease phenotypes.

The objectives are to screen for mutations in the connexin genes, the $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ deletions in *GJB6* gene and mitochondrial mutation A7445G in tRNA^{Ser(UCN)} gene. For mutation analysis, the single coding regions of the connexin genes were sequenced from PCR products. The deletions of the *GJB6* gene were amplified the breakpoint junction of the $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ by PCR and the mitochondrial mutation A7445G were performed using PCR were digested with specific restriction enzymes (*Xba* I).

We report two autosomal dominant mutations different in *GJB2* gene and digenic inheritance with mutations in *GJB2* and *GJB3* genes. The mutations in the connexin genes in individuals with deafness and different skin disorders illustrating the heterogeneity genetic and clinical of the condition.

INTRODUÇÃO

1- Conexinas

1.1- Estrutura e Fisiologia

As conexinas são proteínas transmembrânicas cuja função principal é conectar células adjacentes por canais conhecidos como junções comunicantes (*gap junctions*). A função de *gap junctions* em células e tecidos biológicos é importante, pois permite a comunicação intercelular existente entre quase todas as células de mamíferos. Essas comunicações são compostas por estruturas oligoméricas conhecidas como conéxons, os quais são formados por uma família poligênica de conexinas que medeiam a troca direta de íons, de nutrientes e pequenos metabólitos (<1 kDa) entre o citoplasma das células adjacentes. As comunicações intercelulares mediadas pelas *gap junctions* coordenam múltiplas atividades celulares, sendo importantes para a homeostasia dos tecidos; crescimento e diferenciação celulares; e resposta a estímulos (Willecke *et al.*, 2002). Cada canal de conexina tem propriedade seletivamente permeável para íons e moléculas, proporcionando a abertura de canais e a regulação pós-traducional (Figura 1).

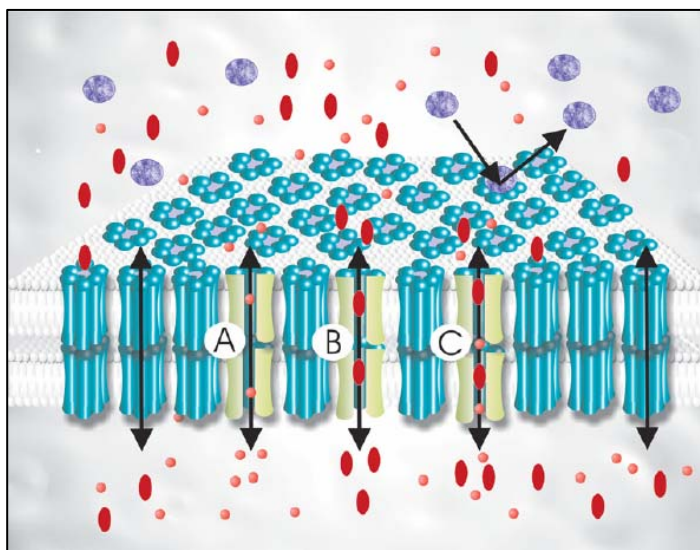


Figura 1- Permeabilidade dos canais *gap junctions*: (A) transporte de pequenas moléculas; (B) transporte de pequenas moléculas com formas alongadas e (C) transporte de uma combinação de ambas as moléculas (Laird, 2006).

Essas propriedades de adesão e comunicação entre as células das *gap junctions* são importantes para manter o fenótipo celular e a arquitetura do tecido normal. Ainda é intrigante o envolvimento de proteínas que formam e regulam essas comunicações intercelulares em diferentes patologias humanas. Mutações em genes conexinas são observadas em uma variedade de doenças genéticas e com diferentes padrões de herança (autossômico dominante ou recessivo, ligado ao cromossomo X dominante ou recessivo).

Os canais intercelulares podem ser compostos por dois hemicanais similares formados pelo mesmo tipo de conexina (homotípico) ou por dois hemicanais distintos, cada um formado por conexinas diferentes (heterotípico). Além disso, cada conéxon poderá ser composto por subunidades de conexinas diferentes formando hemicanais heteroméricos como mostra a Figura 2 (Di *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002).

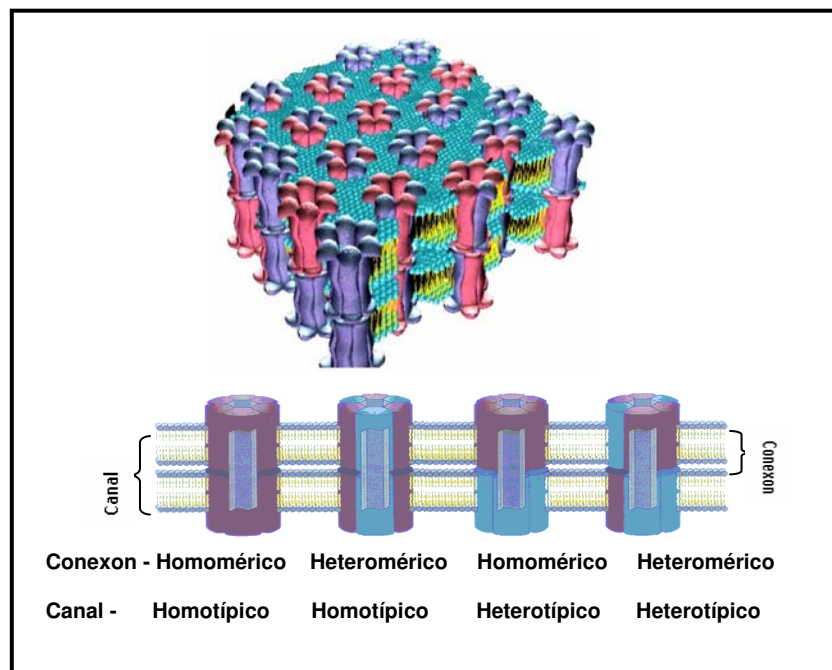


Figura 2- Possíveis arranjos de conéxons para formar canais *gap junctions* (modificado de Korkiamäki, 2002).

A estrutura das conexinas (Figura 3) é arranjada em quatro domínios transmembrânicos com dois *loops* extracelulares (E1 e E2) altamente conservados com resíduos de cisteínas e um *loop* intracelular com seqüências variáveis. Diversas propriedades funcionais são atribuídas aos diferentes domínios da conexina. Cada domínio transmembrânico participa da oligomerização dos canais hexaméricos, assim como, da formação dos hemicanais de conéxons.

Acredita-se que o terceiro domínio transmembrânico contribua para a formação das paredes desses canais e que as diferenças funcionais entre as conexinas localizam-se no *loop* intracelular. A seqüência amino-terminal conservada funciona como fator de ligação e é necessária para a inserção das conexinas na membrana (Forge *et al.*, 2002).

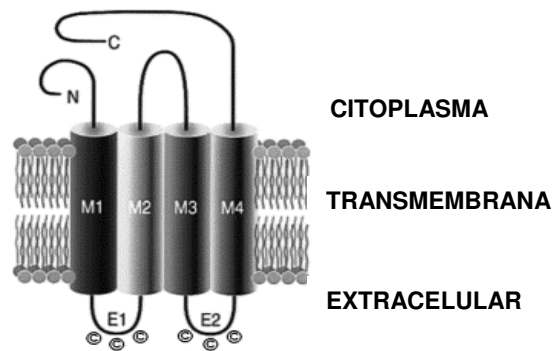


Figura 3- Estrutura das proteínas conexinas (modificado de Söhl *et al.*, 2004).

1.2- Aspectos Moleculares

Além de outros níveis de complexidade, algumas conexinas se expressam mais em determinadas células ou tecidos, sendo assim, apresentam funções específicas. Os tecidos ou células também podem expressar dois ou mais membros de conexina. Os queratinócitos, por exemplo, expressam várias conexinas, a 26, 30, 30.3, 31, 31.1 e 43. Essas proteínas são freqüentemente expressas em tecidos derivados do ectoderma, em particular a epiderme e a

cóclea. Muitos desses genes se expressam não somente na epiderme, mas também nos anexos da pele, epitélio do ouvido interno e da córnea e, em outros epitélios derivados do ectoderma, resultando em uma sobreposição de fenótipos.

A Tabela 1 correlaciona as conexinas que se expressam na cóclea e na pele, assim como os outros diferentes tecidos de expressão. A Figura 4 mostra a localização dos diferentes genes de conexinas estudados nos cromossomos humanos.

Tabela 1- Genes conexinas e sua expressão.

Gene	proteína	Cromossomo lócus	Expressão (órgãos ou tipos de células)
GJB2	Cx26	13q11-q12	Células mamárias, cóclea, placenta, hepatócitos, pele, pâncreas, rins e intestino.
GJB6	Cx30	13q12	Cérebro, cóclea e pele.
GJB3	Cx31	1p34	Cóclea, placenta e pele.
GJB4	Cx30.3	1p35-p34	Pele e rins.
GJB5	Cx31.1	1p35.1	Pele.
GJA1	Cx43	6q21-q23.2	Muitos tipos de células.

(modificado de Oyamada *et al.*, 2005).

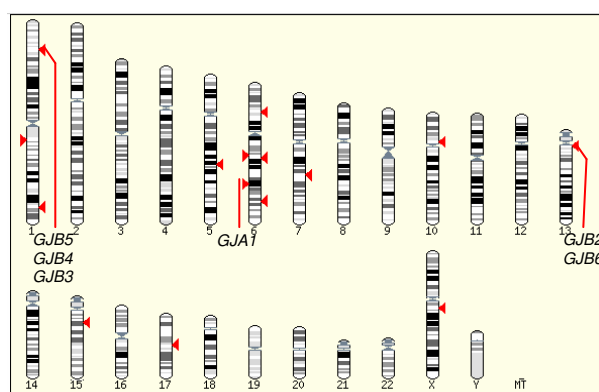


Figura 4- Localização dos genes conexinas nos cromossomos humanos

(modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map>).

Em humanos, os genes codificadores de conexinas exibem padrões similares de expressão. A comparação das seqüências dessas proteínas proporciona alguns esclarecimentos sobre a evolução desses genes, os quais foram divididos em diferentes subgrupos. As conexinas são geralmente classificadas de acordo com sua massa molecular que corresponde ao intervalo de 25 KDa a 65 KDa (Willecke *et al.*, 2002). Alternativamente, elas são agrupadas baseadas na similaridade das seqüências entre os subtipos de *gap junctions*, denominados α (GJA), β (GJB) e, γ (GJC), os quais explicam os símbolos de seus genes.

Recentes estudos em doenças genéticas, juntamente com experimentos em ratos *knock-out*, mostraram evidências diretas de que a comunicação intercelular tipo *gap junction* é essencial para função tecidual e desenvolvimento orgânico e que mutações em genes de conexina causam diferentes doenças (Oyamada *et al.*, 2005).

A inabilidade de outras conexinas em compensar a perda de função de uma conexina alterada em um mesmo tecido é uma característica dos distúrbios relacionados a defeitos nessas proteínas. Essa falta de redundância aumenta a importância de cada conexina e restringe a habilidade das células em compensar as formas de proteínas mutantes, ou seja, de manter a homeostasia dos tecidos e a comunicação celular mediada pelas *gap junctions* (Gerido & White, 2004).

A diversidade biológica das funções das *gap junctions* nas células e tecidos é estudada por meio dos diferentes quadros clínicos das doenças genéticas, envolvendo alterações em conexinas. Existem genes de conexinas implicadas em doenças genéticas humanas, como a perda auditiva, que pode ocorrer de forma isolada ou associada a algumas alterações dermatológicas, indicando a expressão em mais de um tecido (White & Paul, 1999).

2- Alterações Dermatológicas

As alterações dermatológicas hereditárias apresentam uma incidência estimada em 7/10.000 nascimentos, provocada pelo *déficit* de desenvolvimento das camadas da epiderme.

A caracterização do diagnóstico dermatológico é importante não somente para iniciação de terapia apropriada, mas também para detecção de outras anormalidades associadas a essas desordens freqüentemente multisistêmicas.

Os estudos relacionados aos distúrbios dermatológicos identificaram alterações associadas a algumas proteínas estruturais na pele, como queratinas e proteínas que compõem a membrana basal. Esses estudos identificaram a importância do papel das proteínas envolvidas na regulação e formação das comunicações celulares (*junctions*) (Fear *et al.*, 2001). As junções celulares são responsáveis pela adesão e comunicação entre as células, propriedade fundamental para manter o fenótipo celular normal e a arquitetura do tecido. As doenças de pele podem ocorrer por alteração em três formas de junções entre as células, os desmossomos, *adherens junctions* e as *gap junctions*.

Os desmossomos são duas placas circulares de proteínas de onde partem filamentos constituídos por outras proteínas, que atravessam as membranas plasmáticas e atingem espaço entre as células onde se associam. Essa associação dos filamentos no espaço intercelular mantém as duas placas desmossômicas unidas e, conseqüentemente, as células que as contêm, que são importantes para a sua rigidez e resistência (Cowin *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1996). As *adherens junctions* consistem em um complexo intercelular de α , β e γ catenina, que formam uma ponte composta de caderinas capaz de ligar os filamentos de actina do citoplasma das células (Cowin *et al.*, 1996). As *gap junctions* são formadas pelas proteínas conexinas descritas anteriormente.

A associação de distúrbios de queratinização e perda auditiva com mutações em genes de conexinas reforçam a importante função dessas proteínas na diferenciação epitelial e na transdução auditiva (Richard, 2000; Xia *et al.*, 2001; Di *et al.*, 2001).

Dessa forma, o estudo das dermatopatias está associado a diferentes proteínas, conseqüentemente, a diferentes genes, assim como a uma grande variedade de fenótipos e condições dermatológicas, como as descritas a seguir.

3- Alterações em genes conexinas associadas a diferentes fenótipos

3.1- Gene *GJB2* (Cx26)

As primeiras mutações no gene *GJB2* foram encontradas em indivíduos com surdez neurossensorial não sindrômica (Kelsell *et al.*, 1997). Essas mutações representam a causa genética mais comum de perda auditiva profunda (Petit *et al.*, 2001; Van Camp and Smith, 2006). Subseqüentemente, foram descritas mutações dominantes no gene *GJB2* em casos com perda auditiva associada a distúrbios de queratinização. Essas dermatopatias representam uma série de alterações hereditárias com fenótipos variáveis, porém com anormalidades genéticas semelhantes. A ceratodermia palmoplantar com perda auditiva (PPK – *palmoplantar keratoderma*), a Síndrome de Vohwinkel (VS), a Síndrome KID (*keratitis-ichthyosis-deafness syndrome*) e a Síndrome HID (*hystrix-like ichthyosis deafness syndrome*) estão entre as dermatopatias observadas (Kelsell *et al.*, 2001; Richard, 2001).

Apesar da diversidade de manifestações encontradas nessas síndromes, existem características genéticas e fenotípicas comuns a todas as doenças. Geneticamente, todos os distúrbios mencionados resultam de mutações no gene *GJB2*, sendo que a natureza e o local de cada mutação determinam o tipo de síndrome. Fenotipicamente, as alterações encontradas na pele relacionadas com mutações na conexina 26 apresentam grande variabilidade, geralmente envolvendo o aumento da espessura da camada externa da pele. Isto indica que as conexinas exercem um papel crítico na manutenção do equilíbrio entre a proliferação e diferenciação da epiderme, resultando em diversas conseqüências quando esta sofre interferência de alelos mutantes do gene *GJB2* (Gerido & White, 2004).

Os defeitos da comunicação celular causado por mutações no gene *GJB2* podem reduzir o transporte de K^+ entre as células, diminuindo a reciclagem e aumentando a concentração de K^+ no espaço perilinfático entre as células ciliadas e as células de suporte. Conseqüentemente, pode ocorrer morte das

células ciliadas e de suporte devido à despolarização crônica e outros mecanismos (Cohen-Salmon *et al.*, 2002). Alternativamente, conexinas mutantes podem alterar a permeabilidade seletiva formando canais permeáveis de K⁺, porém com permeabilidade limitada para grandes solutos, afetando a função celular (Zhang *et al.*, 2005).

A maioria das mutações recessivas no gene *GJB2* parece resultar da perda da função da proteína Cx26, que pode levar a redução do número de hemicanais homoméricos ou a alteração da taxa entre conéxons homoméricos e heteroméricos formados pelas conexinas (Xia *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002). As mudanças ocorridas no sistema *gap junction* interferem na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva, resultando no não funcionamento das células ciliadas e do potencial elétrico endococlear (Kikuchi *et al.*, 1995).

3.1.1- Ceratodermia palmoplantar (PPK) associada à perda auditiva

As PPKs são anormalidades na pele, as quais representam um grupo heterogêneo de doenças que se caracterizam pelo espessamento cutâneo difuso ou focal das palmas e plantas com coloração amarelada característica. Podem ser classificadas com base em seus padrões clínicos específicos e na associação com outras características cutâneas sistêmicas (Kelsell & Stevens, 1999).

Essa entidade pode estar associada à surdez neurosensorial e ser decorrente de mutações dominantes no gene *GJB2*. O espectro fenotípico desses distúrbios inclui surdez pré-lingual bilateral, PPK difusa e fissurada devido à mutação R75W e PPK leve com calosidade devido a deleção 42delE na conexina 26 (Richard *et al.*, 1998a; Rouan *et al.*, 2001). Outras mutações no gene *GJB2*, tais como a G59A e R75Q, foram encontradas em famílias com surdez neurosensorial progressiva e PPK (Heathcote *et al.*, 2000; Uyguner *et al.*, 2002). As mutações missense R75Q (R: arginina; Q: glutamina) e R75W (W: triptofano) causam perda auditiva profunda autossômica dominante com algumas alterações

de pele (Richard *et al.*, 1998; Rabionet *et al.*, 2000; Feldmann *et al.*, 2005). Essas observações, somando-se ao fato da arginina ser extremamente conservada entre as outras conexinas, sugerem a importante função do aminoácido nessa posição. Na tentativa de esclarecer as propriedades de cada resíduo e entender o mecanismo da surdez genética causada por essas alterações, o estudo funcional da substituição da arginina na posição (R75) da conexina 26 com diferentes resíduos revelou que a arginina, nesse local, é essencial para gerar canais *gap junction* funcionais formados por essa conexina (Deng *et al.*, 2006).

Todas as mutações dominantes no gene *GJB2* com envolvimento cutâneo e deficiência auditiva estão localizadas no primeiro *loop* extracelular da Cx26, as quais interferem nas funções desse domínio que são essenciais para a diferenciação normal dos queratinócitos e para a homeostasia do epitélio da cóclea (Forge *et al.*, 2002).

3.1.2- Síndrome de Vohwinkel (SV)

A Síndrome de Vohwinkel é uma condição autossômica dominante e está caracterizada por PPK difusa associada a constrições digitais circulares suficientes para causar auto-amputação, placas hiperkeratóticas lineares nas extremidades e perda auditiva moderada (Maestrini *et al.*, 1999). Dois estudos genéticos revelaram que a Síndrome de Vohwinkel é resultante da mutação D66H no gene *GJB2*, sugerindo ser uma mutação comum na SV clássica. A D66H ocorre em uma região altamente conservada do primeiro domínio extracelular da proteína Cx26 e pode exercer seu efeito interferindo na união entre conexons de células adjacentes ou nas propriedades das *gap junctions*, prejudicando a diferenciação da epiderme e a função do ouvido interno (Maestrini *et al.*, 1999; Kelsell *et al.*, 2000). Foi identificada uma família com SV associada à perda auditiva progressiva e a mutações em diferentes genes conexinas, a mutação R32W no gene *GJB3* e as mutações D66H e M34T no gene *GJB2* (Kelsell *et al.*, 2000). A relação genótipo-fenótipo desta família sugeriu que a

mutação estava associada à perda auditiva e ceratodermia palmoplantar. No entanto, Lopez-Bigas (2001), notificou que a mutação R32W representa um polimorfismo neutro comum, com uma frequência alélica de 7,5% na população espanhola e que esta não segrega com perda auditiva em várias famílias. Apesar disso, acredita-se que a expressividade da mutação R32W pode depender do *background* genético do indivíduo, ou seja, é possível que R32W somente determine a perda auditiva quando associada a uma segunda mutação em outro alelo no gene *GJB3* ou em outro gene também associado à perda auditiva (Rouan *et al.*, 2003).

3.1.3- Síndrome KID

A Síndrome KID é uma displasia ectodérmica hereditária que afeta a epiderme e outros tecidos ectodérmicos, tais como, o epitélio da córnea e o ouvido interno. É clinicamente caracterizada por ceratites, ictiose congênita e perda auditiva neurosensorial, uma tríade clínica que indica uma falha múltipla no desenvolvimento e diferenciação do epitélio estratificado (Caceres-Rios *et al.*, 1996). Nesses casos, a surdez neurosensorial, freqüentemente bilateral e as características cutâneas variam entre os pacientes. Alguns indivíduos desenvolvem placas eritematosas e hiperkeratóticas que são simetricamente distribuídas na face e nas extremidades. Outros apresentam a pele espessada com aparência de grãos ou hiperkeratose folicular sem eritema. Uma característica comum é a ceratodermia palmoplantar com padrões de superfície pontiaguda, enquanto a distrofia nos cabelos e unhas, anormalidades dentárias e intolerância ao calor são menos freqüentes. A síndrome KID também está associada ao aumento da susceptibilidade a infecções cutâneas, carcinomas de pele e cavidade oral (Richard *et al.*, 2003).

Recentemente, estudos moleculares revelaram mutações *missense* em heterozigose no gene *GJB2* relacionadas a Síndrome KID. A mutação D50N é muito comum nessa síndrome e foi observada tanto em casos esporádicos como

em casos familiares, confirmando um padrão de herança dominante nessa doença (Richard *et al.*, 2002; van Steensel *et al.*, 2002). Esta mutação ocorre em uma região altamente conservada do primeiro *loop* extracelular da Cx26, a qual está envolvida na regulação da interação específica entre conéxons. No mesmo códon, também foi encontrada a mutação D50Y em heterozigose em um paciente com KID. A gravidade fenotípica das mutações D50N e D50Y parece ser semelhante (Yotsumoto *et al.*, 2003). Contudo, o espectro fenotípico da mutação D50N também abrange a Síndrome HID, caracterizada por ictiose (hiperceratoses acentuadas) e surdez. As síndromes KID e HID se distinguem principalmente com dados encontrados na microscopia eletrônica (van Geel *et al.*, 2002). Essas observações demonstraram que estas doenças são provavelmente uma variante alélica de uma mesma síndrome, podendo estar geneticamente relacionadas. Foram ainda descritas outras mutações (G12R, S17F e N14Y) na Síndrome KID, que afetam a extremidade amino terminal da Cx26, a qual é conservada em todas as β conexinas de diferentes espécies, podendo modificar a estrutura deste domínio (Arita *et al.*, 2006).

Mutações dominantes presentes na Síndrome KID inibem a função coexistente das conexinas, como também é demonstrado em outras alterações dominantes no gene *GJB2*, causando PPK e perda auditiva neurossensorial (Richard *et al.*, 2002).

3.1.4- Outros distúrbios relacionados a mutações dominantes no gene *GJB2*

Várias características clínicas e histopatológicas das Síndromes de Vohwinkel e KID se sobrepõem a Síndrome de Bart-Pumphrey (BPS, MIM 149200). Esta entidade é caracterizada por uma tétrade clínica que reúne leucodermia, knocks pads, PPK e surdez. Recentes estudos realizados em várias gerações de famílias com Síndrome de Bart-Pumphrey sugerem que esta variante de PPK e surdez também possam estar associadas a mutações no gene *GJB2*

(Richard *et al.*, 2001). Uma nova mutação no gene *GJB2* (N54K) foi descrita em uma família com BPS como sendo responsável por distúrbios dermatológicos associados a perda auditiva (Richard *et al.*, 2004). Além disso, a mutação G59S foi encontrada em um paciente com BPS, confirmando esta associação de mutações no gene *GJB2* com a Síndrome de Bart-Pumphrey (este trabalho - Alexandrino *et al.*, 2005).

Brown e colaboradores (2003) descreveram a mutação F142L em um paciente com psoríase e envolvimento mucocutâneo, inflamação das membranas mucosas e deficiência auditiva neurosensorial bilateral profunda, sem as características clássicas das Síndromes de Vohwinkel, KID e HID.

A origem ectodérmica comum da pele e das células epiteliais não sensoriais do órgão espiral, o qual se expressa a Cx26, sugere que mutações dominantes no gene *GJB2* estão associadas a fenótipos clínicos diferentes.

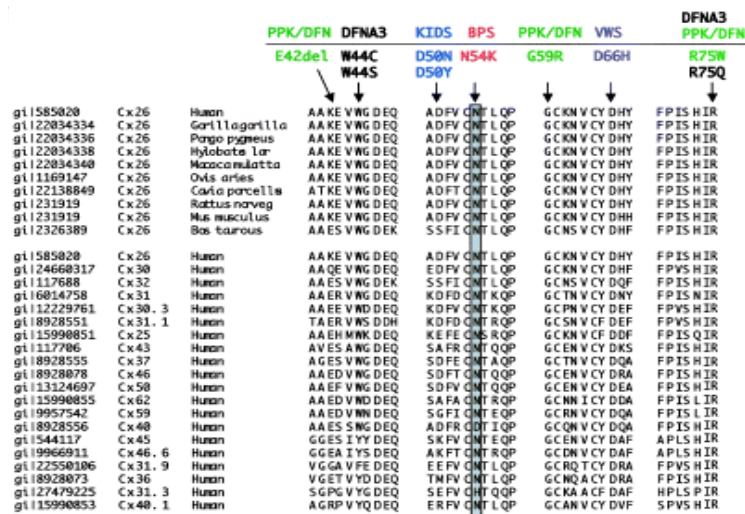


Figura 5- Localização de diferentes mutações dominantes no gene *GJB2* no primeiro domínio extracelular, mostrando a conservação desta região em diferentes espécies (Richard *et al.*, 2004).

3.2- Gene *GJB6* (Cx30)

O gene *GJB6* foi mapeado em 13q12 e clonado em 1999 (Grifa *et al.*, 1999), codificando uma proteína de 261 aminoácidos. Esta proteína apresenta 76% de homologia com o gene *GJB2*. Estudos imunocitoquímicos demonstraram que as conexinas 26 e 30 estão presentes na cóclea a partir da 22ª semana de desenvolvimento embrionário (Lautermann *et al.*, 1999). Além disso, alguns estudos de hibridização *in situ* revelaram a alta expressão da conexina 30 no cérebro, na cóclea e na pele.

3.2.1- Displasia Ectodérmica Hidrótica (HED)

Mutações no gene *GJB6* causam displasia ectodérmica hidrótica também conhecida como Síndrome de Clouston (MIM 129500). A HED é um distúrbio autossômico dominante caracterizado por hiperqueratose palmoplantar, alopecia, hipoplasia e deformidades nas unhas. Frequentemente ocorre discreta hiperpigmentação da pele e dismorfismos faciais leves. No entanto, esses sinais associados à perda auditiva neurosensorial são raros (Lamartine *et al.*, 2000a).

Foram identificadas duas mutações no gene *GJB6*, as quais segregam com HED em 12 famílias Franco-Canadenses e em outras populações (Lamartine *et al.*, 2000b). A mutação G11R está localizada na extremidade amino-terminal da Cx30, e a mutação A88V encontram-se no segundo domínio transmembrânico. Além disso, uma mutação *de novo*, V37E, localizada no primeiro domínio transmembrânico, foi detectada em um paciente com HED (Smith *et al.*, 2002). Essa mesma mutação também foi encontrada em um paciente com características da Síndrome KID e atresia congênita. A variabilidade fenotípica dessa mutação revela a influência dos fatores genéticos e epigenéticos que modificam o fenótipo clínico (Jan *et al.*, 2004). Há descrição de que a mutação T5M esteja relacionada apenas à surdez autossômica de padrão de herança dominante.

Além disso, há duas mutações no gene *GJB6* que estão envolvidas nos casos de surdez não síndrômica com padrão de herança autossômica recessiva. As deleções, $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ aparentemente não causam alterações no gene *GJB2*, resultando em um gene *GJB6* defeituoso. Essa grande perda de aminoácidos, 342kb e 232kb respectivamente, pode estar presente em homozigose (herança monogênica) ou em *trans* com mutações no gene *GJB2* (herança digênica) (Grifa *et al.*, 1999; del Castillo *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2005).

3.3- Gene *GJB3* (Cx31)

Foi mapeado um *locus* no cromossomo humano 1p34-p35.1 com quatro genes conexinas *GJB3* (Cx31), *GJB4* (Cx30.3), *GJB5* (Cx31.1) e *GJA4* (Cx37). Em 1998, Richard identificou o gene *GJB3* e detectou mutações patogênicas em quatro famílias com EKV, associando pela primeira vez o sistema *gap junctions* a distúrbios de diferenciação e função epidermal. Essas mutações interferem na estrutura e função normais da conexina 31, possibilitando um efeito dominante negativo. Desse modo, os resultados do trabalho de Richard mostraram que a comunicação intercelular mediada por Cx31 é crucial para a diferenciação epidermal.

3.3.1- Eritroceratoderma *Variabilis* (EKV)

A EKV é uma condição clínica que pertence a um grupo heterogêneo de eritroceratodermias. Frequentemente é herdada com padrão autossômico dominante, podendo também, com menos frequência, apresentar o padrão de herança autossômica recessiva. Pode se manifestar ao nascimento ou durante a infância e persiste ao longo da vida com períodos de agravamento e de latência. Essa alteração é caracterizada pela coexistência de eritemas transitórios, que se modificam rápido e continuamente, por isso a designação *variabilis* e hiperkeratose localizada ou generalizada que pode ser desencadeada por

alterações de temperatura, fricção e outros fatores ambientais e endógenos (Richard *et al.*, 2000). A EKV (MIM 133200) foi a primeira anomalia de pele associada a conexina, que foi mapeada numa região do cromossomo 1p34-p35.1 e abriga um grupo de quatro genes de conexinas, Cx30.3, Cx31, Cx31.1 e Cx37 (Richard *et al.*, 1997).

A análise da sequência de DNA do gene *GJB3* nas famílias e em casos esporádicos de EKV revelou a presença de mutações em heterozigose. Todas as mutações descritas substituem aminoácidos conservados entre as β conexinas (Richard *et al.*, 2000). Estudos que correlacionam o genótipo-fenótipo dessa doença sugerem que certas mutações podem relacionar-se a um fenótipo mais grave com hiperqueratose generalizada, enquanto em outras, observam-se EKV com placas hiperqueratóticas localizadas (Richard *et al.*, 2001). Ao contrário de muitas mutações na conexina 26 que produzem lesões cutâneas, as mutações relacionadas a EKV não afetam o primeiro domínio extracelular, e sim estão localizadas na extremidade amino terminal e no domínio transmembrânico da conexina 31.

A Cx31 se expressa na pele e no epitélio sensorial do ouvido interno, da mesma forma que as Cx26 e Cx30. Portanto, não é surpreendente que mutações no gene *GJB3* estejam segregando com a perda auditiva neurosensorial não síndrômica com padrão de herança autossômica recessiva ou dominante, sendo associados também a casos de neuropatia auditiva (Liu *et al.*, 2000; Lopez-Bigas *et al.*, 2001).

3.4- Gene *GJA1* (Cx43)

O gene *GJA1* humano é candidato da condição pleiotrópica de ODDD (displasia oculodentodigital) porque tem local e níveis de expressão variados. A conexina 43 é expressa no coração e tem um papel crucial na contração sincronizada do coração e desenvolvimento embrionário, que regula a ligação célula-célula do miocárdio. A conexina 43 também se expressa por toda camada

da epiderme e certas mutações no gene *GJB2*, com fenótipo de alterações na pele, exercem um efeito trans-dominante sobre a função da conexina 43, o que também pode esclarecer as diversas manifestações clínicas associadas a mutações no gene *GJB2* (Rouan *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2004). Kellermayer e colaboradores (2005) descreveram um paciente com displasia ectodérmica hidrótica heterozigoto composto com uma nova mutação no gene *GJA1* (V41L) associada à mutação R127H no gene *GJB2*.

3.4.1- Displasia Oculodentodigital (ODDD)

Mutações no gene *GJA1* com padrão de herança autossômica dominante são responsáveis por um desenvolvimento multissistêmico de displasia oculodentogital (MIM 164200). Esta síndrome caracteriza-se por apresentar um grande espectro de sinais clínicos como anomalias oftalmológicas (microftalmia, microcórnea, glaucoma, catarata e anormalidades na íris), anomalias dentais (microdontia, anodontia, cáries múltiplas), anomalias nas mãos e dedos como sindactilia, campdactilia e clinodactilia, e hipoaplasia ou aplasia de falanges médias. Sintomas neurológicos como deficiência mental e ataxia podem estar presentes, assim como, a perda auditiva. O gene *GJA1* humano é um gene candidato da condição pleiotrópica de ODDD porque tem local e níveis de expressão variados.

3.5- Gene *GJB4* (Cx30.3)

Estudos mostram a identificação de mutações nas conexinas 31 e 30.3 como causa de eritroceratoderma autossômica dominante (EKV MIM 133200), caracterizada por placas hiperkeratóticas fixas e áreas eritematosas transientes (Richard *et al.*, 2003; Kelsell *et al.*, 2000). Há similaridade nas características clínicas de pacientes com EKV devido a mutações na conexina 31 e 30.3 com diferenças mínimas. Essa similaridade do fenótipo clínico sugere que as conexinas

31 e 30.3 podem interferir na estrutura e na função molecular, sendo essa interação importante para a homeostasia epidermal (Plantard *et al.*, 2003). A grande maioria das mutações nessas conexinas localiza-se nos domínios transmembrânicos das proteínas, que corresponde à região mais conservada das conexinas.

3.6- Gene *GJB5* (Cx31.1)

A conexina 31.1 é amplamente expressa na pele (Goliger *et al.*, 1994). As conexinas 30.3 e 31.1 são os primeiros exemplos de genes que estão localizados a uma pequena distância (3,4kb) no mesmo cromossomo. Esta proximidade entre esses genes e também com o gene da conexina 31 pode explicar a similaridade dos níveis de expressão e a função entre eles (Hennemann *et al.*, 1992).

A complexidade e a redundância do sistema *gap junction* são responsáveis pela confusa correlação genótipo-fenótipo observada nos distúrbios envolvendo as conexinas humanas, nos quais, mutações em um mesmo gene podem causar doenças distintas e comprometimento de diferentes tecidos.

4- Distúrbios de Queratinização e Conexinas

A fisiopatologia dos distúrbios de queratinização está relacionada às vias de comunicação das conexinas, que implicam na regulação do crescimento, migração e diferenciação celular.

Diferentes padrões de expressão dos genes de conexinas podem refletir no grau e extensão da doença. Considerando que outras conexinas não conseguem compensar a perda da função de uma conexina alterada, acredita-se que exista uma interação gênica entre as conexinas que estão se expressando no tecido ectodérmico que possam modular o fenótipo ou manter o estado normal da epiderme.

Por possuírem apenas um exon codificante, os genes *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *GJA1*, *GJB4* e *GJB5* são facilmente rastreados quanto à presença de mutações em pacientes com distúrbios de queratinização isolados ou associados à deficiência auditiva, proporcionando um diagnóstico rápido e preciso. Além disso, a correlação genótipo-fenótipo poderia eventualmente levar a uma classificação molecular das diferentes expressões fenotípicas observadas nos distúrbios de queratinização e contribuir não só para o conhecimento geral nessa área, mas também em nível individual na investigação diagnóstica e no aconselhamento genético.

5- Distúrbios de queratinização associados ao DNA mitocondrial

Além das proteínas conexina, a mutação A7445G no gene mitocondrial (mtDNA) foi relatada inicialmente em uma família da Nova Zelândia, cuja avaliação clínica demonstrou perda auditiva neurossensorial com padrão de herança materno e ceratoderma palmoplantar (PPK) em muitos membros dessa família. A mesma mutação também foi detectada em uma família japonesa com PPK e surdez neurossensorial progressiva (Sevior *et al.*, 1998). Posteriormente, outros autores descreveram a relação da mutação A7445G com perda auditiva e PPK (Martin *et al.*, 2000 e Caria *et al.*, 2005). Os efeitos dessa alteração molecular na função celular ainda não são esclarecidos. A mutação A7445G é uma alteração no nucleotídeo adjacente na posição 3' terminal do gene tRNA^{Ser}(UCN). Alguns estudos indicam que a mutação afeta o processo normal na tradução do mRNA, causando uma significativa diminuição no nível de serina no tRNA e na taxa da síntese de proteína mitocondrial. O efeito tecido-específico, a despeito do estado homoplásmico da mutação, pode resultar de diferentes processos no RNA mitocondrial e na proteína. Outros estudos precisam esclarecer melhor o significado funcional da mutação A7455G na sequência que codifica o precursor de serina no tRNA e identificar uma possível proteína alvo comum na orelha interna e na epiderme (Guan *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Estudo molecular em pacientes com diagnóstico clínico de distúrbios de queratinização associado à perda auditiva e distúrbios de queratinização de forma isolada com etiologia não esclarecida.

Objetivos Específicos

Triagem das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*.

Triagem da mutação mitocondrial A7445G no gene tRNASer(UCN).

Rastreamento de mutações nos seguintes genes conexinas relacionados a distúrbios de queratinização: *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30), *GJB3* (Cx31), *GJA1* (Cx43), *GJB4* (Cx30.3) e *GJB5* (Cx31.1).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Casuística

Foram estudados 15 casos índices com distúrbios de queratinização isolado ou associado à perda auditiva, selecionados em diferentes ambulatórios conforme mostra a Tabela 2:

1. Ambulatório de Genodermatose HC/Unicamp – Genética Clínica FCM (Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp).
2. Ambulatórios de Dermatologia HC/Unicamp – Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Dermatologia Clínica.
3. Outros serviços – Encaminhados por profissionais da área correlatas.

O parecer de aceitação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa está em anexo, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentado aos pacientes.

Tabela 2- Relação dos pacientes estudados na casuística do trabalho

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Recorrência familiar	Suspeita Clínica	Características	Procedência
1	M	26	Pai	Síndrome Bart-Pumphrey	<i>knuckle pad</i> (nódulos verrucosos nas articulações dorsais das mãos e pés) e hiperkeratose palmoplantar com início desde os três anos de idade. Nos exames audiológicos como audiograma e BERA, mostraram perda auditiva neurossensorial grave.	Genodermatose-FCM ¹
2	M	8		Eritrodermia e Hipoacusia	Eritemas localizados nas mãos e nos pés, com placas pequenas nos cotovelos.	Dermatologia HC ²
3	F	30		KID	Lesões de pele, perda auditiva e ceratites	Genodermatose-FCM
4	M	-		PPK + DA	Ceratoderma palmoplantar e hipoacusia	Outros serviços ³
5	F	38	Dois irmãos surdos	Eritrodermia congênita	Eritema disseminado em todo corpo com ressecamento e descamação da pele.	Dermatologia HC
6	F	8		Eritrodermia Ictiosiforme	Áreas de pele com lesões eritematosas descamativas, com aspecto de escamas de peixe.	Dermatologia HC
7	F	6	Mãe Perda auditiva	Eritrodermia Ictiosiforme	Áreas de pele com lesões eritematosas descamativas, com aspecto de escamas de peixe.	Dermatologia HC
8	F	16		PPK	Espessamento da pele das plantas dos pés e palmas das mãos desde o nascimento com hiperkeratose de todas as unhas e onicodistrofia.	Dermatologia HC

9	F	17		Paquioníquia congênita	Hiperkeratoses palmoplantar e perda auditiva profunda. Ao exame dermatológico foi notada distrofia intensa de todas as unhas, incluindo hiperkeratose subungueal (unhas em ômega) e coloração amarelo-acinzentada. Há hiperkeratose palmoplantar amarelada difusa com fissuras e xerose nas pernas. A paciente apresenta espessamento das unhas desde o nascimento e das palmas e plantas há 4 anos. Aos 3 anos de idade foi diagnosticado a hipoacusia bilateral neurosensorial.	Dermatologia HC
10	M	9	Irmão e Mãe	Eritrodermia congênita	Eritema disseminado em todo corpo com ressecamento e descamação da pele.	Dermatologia HC
11	M	8		EKV	Placas hiperkeratóticas em toda superfície e essas manchas são transientes por toda extensão do corpo e ceratodermia palmoplantar.	Dermatologia HC
12	M	-		PPK + DA	Ceratodermia palmoplantar e perda auditiva	Outros serviços
13	M	46		S. Clouston	Hiperkeratose palmoplantar, alopecia, hipoplasia, deformidades nas unhas, hipotricoses	Genodermatose
14	M	16		Eritrodermia congênita	Eritema disseminado em todo corpo com ressecamento e descamação da pele.	Dermatologia HC
15	M	13		PPK	Hiperkeratose palmoplantar	Dermatologia HC

(F) feminino; (M) masculino; (-) sem informação

2- Estratégia de Análise

Inicialmente foram analisadas as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*, uma vez que essas mutações representam as principais causas de surdez de etiologia genética. A mutação A7445G no DNA mitocondrial localizada no gene tRNA^{Ser(UCN)} também foi analisada devido a sua associação com perda auditiva e PPK.

Posteriormente procedeu-se o rastreamento completo de mutações nos genes *GJB2*, *GJB6*, *GJB3*, *GJA1*, *GJB4* e *GJB5* pela técnica de seqüenciamento automático.

3- Métodos

3.1- Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 5 mL de sangue total, coletados em tubos *Vacutainer*® contendo EDTA 10%, de acordo com o protocolo adaptado ao laboratório de Genética Humana – CBMEG/Unicamp.

A lise das hemácias foi realizada acrescentando ao sangue coletado 35mL da solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0). Após homogeneização, a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20mL de solução A, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente e retirou-se o sobrenadante. Em seguida ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de solução B 2X concentrada (Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0), e adicionou-se 250µl de solução C preparada na hora (para 1 mL de solução C: 0,5 mL de solução B, 1 mg de Proteinase K (*Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha*), 0,5 mL de SDS 10%). Incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C por aproximadamente 18 horas a 56°C durante 2 horas.

Após a incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio, que permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras 1,25 mL de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizou-se por inversão lenta os tubos por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, descartando o precipitado, e esta etapa de extração com fenol foi repetida por mais uma vez. À fase aquosa coletada anteriormente acrescentou-se fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção (25:24:1) e centrifugou-se novamente a 2.500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, para a separação da fase aquosa.

O DNA, presente na fase aquosa, foi precipitado adicionando 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após inversão lenta do tubo obteve-se a precipitação do DNA, o qual foi coletado com o auxílio de um bastão e em seguida lavado com etanol 70% para retirar o excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspendeu-se em um volume de 200 a 500µl de TE 1X (TE 10X Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para que o DNA entrasse em solução.

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

3.2- Detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ envolvendo o gene *GJB6*

A estratégia de análise destas deleções foi previamente descrita por del Castillo e colaboradores (2005), que desenvolveram um único teste diagnóstico envolvendo as duas deleções em um mesmo PCR. Os fragmentos de DNA

amplificados contêm os pontos de quebra de ambas as deleções, bem como um segmento do exon 1 do gene *GJB6*, que é usado como controle para checar a eficiência da PCR e distinguir os genótipos heterozigoto e homozigoto das deleções. Um conjunto de três pares de *primers* resulta em dois produtos diferentes de amplificação de PCR: 333pb referente ao exon 1 do gene *GJB6*, 460pb e 564pb relacionados as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, respectivamente. A Figura 6 resume esquematicamente as regiões amplificadas para detecção da mutação.

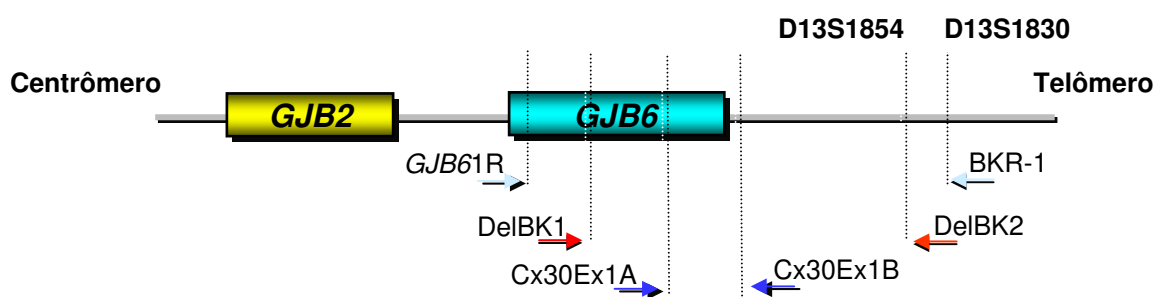


Figura 6- Estratégia para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1830)$.

3.3- Rastreamento da mutação A7445G no gene $tRNA^{Ser(UCN)}$

A região 7445 do DNA mitocondrial foi amplificada por PCR usando os *primers* descritos na Tabela 3 e segundo o programa representado na Figura 7. Os produtos amplificados foram submetidos à digestão enzimática com a enzima *Xba* I, a 37° C por 2 horas, da seguinte forma: 17,5µl de produto de PCR; 2,0µl de tampão da enzima (10x *React* 2) e 0,5µl da enzima *Xba* I (Invitrogen, Brasil).

Após a digestão o fragmento de 1822 pb é clivado em 3 fragmentos de 846, 541 e 435 pb. A presença da mutação leva a perda de um sítio de restrição, gerando apenas dois fragmentos de 1387 e 435 pb.

Os produtos de PCR e de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x.

Tabela 3- Seqüência de *primers* para a amplificação da região do gene tRNA^{Ser(UCN)}.

Par	Posição	Primers 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	6900	MIT 2F - AAT GAT CTG CTG CAG TGC T	1822	54
	8721	MIT 2R - CCT TTA GTG TTG TGT ATG GT		

(Anderson *et al.*, 1998).

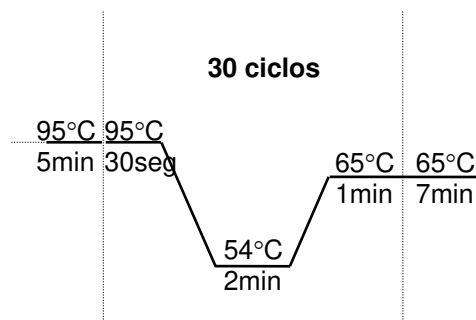


Figura 7- Programa de PCR do gene tRNA^{Ser(UCN)}.

3.4- Amplificação dos Genes conexinas

Os genes *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30), *GJB3* (Cx31), *GJA1* (Cx43), *GJB4* (Cx30.3) e *GJB5* (Cx31.1) foram amplificados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando as seqüências de *primers* específicas para cada gene. Os *primers* (iniciadores de síntese) são oligonucleotídeos sintéticos a partir dos quais os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados e se inicia a síntese da cadeia de DNA de acordo com a complementaridade de bases (A-T/C-G). As seqüências dos *primers* estão descritas nas Tabelas 4 a 9, de acordo com as seqüências de cada gene, obtidos a partir dos bancos de dados ou descritos por alguns autores.

A amplificação dos genes consistiu em 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (*sense* e *antisense*), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) com tampão de PCR 10X (Tris–HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl₂, em um volume final de 50µL de reação. Foram utilizados 30 ciclos de amplificação de acordo com a temperatura de anelamento (TA) de cada *primer*, especificados nas Tabelas e esquematizado na Figura 8.

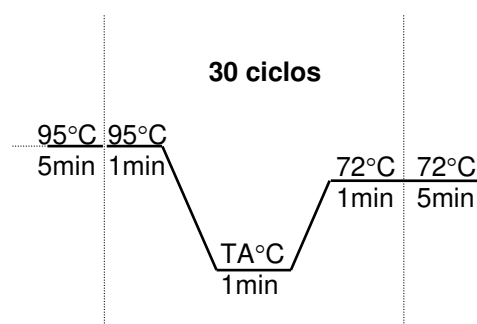


Figura 8- Programa de PCR para amplificação dos genes conexinas.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x como descrito anteriormente para eletroforese de DNA genômico.

3.4.1- Gene *GJB2* (Cx26)

GenBank número de acesso: M86849 - 682pb

Tabela 4- Sequência de *primers* para amplificação do gene *GJB2*.

Par	Posição	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-32	Cx1F - TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC	284	62
	254	Cx1R - GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG		
2	172	Cx2F - CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG	328	62
	479	Cx2MR - CAG CCG CTG CAT GGA GAA G		
3	438	Cx3F - CGA AGC CGC CTT CAT GTA CG	255	62
	692	Cx2R - GGG CAA TGC GTT AAA CTG GC		

Os *primers* Cx1F, Cx1R, Cx2F e Cx2R foram descritos por Kelsell *et al.*, 1997 e Cx2MR e Cx3F foram descritos no presente trabalho para melhor qualidade do seqüenciamento do gene.

3.4.2- Gene *GJB6* (Cx30)

GenBank número de acesso: NM006783 - 786pb

Tabela 5- Seqüência de *primers* para amplificação do gene *GJB6*.

Par	Posição	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-194	Cx30F1 - AGA ATG CTT TCA GGG TGG G	586	60
	372	Cx30R1 - GAC CCC CTC TAT CCG AAC CTT		
2	315	Cx30F2 - TTC AGG CGA GGA GAG AAG AG	500	60
	815	Cx30R2 - TGA CGC AGC TAC ATT TTA CCT T		

(Grifa *et al.*, 1999).

3.4.3- Gene *GJB3* (Cx31)

GenBank número de acesso: AF099730 - 813pb.

Tabela 6- Seqüência de *primers* para amplificação do gene *GJB3*.

Par	Posição	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-35	Cx1F - ATT CTC TCA GGT AGG CAC GG	396	62
	342	Cx2R - CTG CGT TGT CGT ACA GCT TG		
2	261	Cx3F - CTC GCT GCT GGT CAT CCT	373	62
	634	Cx4R - GGC AGA TGA GGT AGC AGA GC		
3	433	Cx4F - TTC CTC TAC CTG CTG CAC AC	392	62
	825	Cx5R - CCT GCC CTG TGG TCA GAT		

(Xia *et al.*, 1998).

3.4.4- Gene *GJA1* (Cx43)

GenBank número de acesso: NM000165O - 1149pb.

Tabela 7- Seqüência de *primers* para amplificação do gene *GJA1*.

Par	Posição	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-127	Cx1F - AGA AAT ACG TGA AAC CGT TGG	501	58
	373	Cx1R - TGT CCA CAT TGA CAC CAT CA		
2	3	Cx2F - GGG TGA CTG GAG CGC CT	730	58
	731	Cx2R - CTC TTT CCC TTA ACC CGA TC		
3	497	Cx3F - AGG TGG CCT TCT TGC TGA T	750	58
	1245	Cx3R - CCT CCA CCG GAT CAA AAT TA		

(Kellermayer *et al.*, 2005).

3.4.5- Gene *GJB4* (Cx30.3)

GenBank número de acesso: NM153212 - 801pb

Tabela 8- Seqüência de *primers* para amplificação do gene *GJB4*.

Par	Posição	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-54	Cx30.3 1F - CAG GTA GCA CCC AGG TAT AG	506	58
	452	Cx30.3 1R - CGG TGG AAG ATA TAG AGG AAG		
2	346	Cx30.3 2F - CTG TAC GAC AAC CTG AGC AAG	511	58
	856	Cx30.3 2R - CCT GGG TGG CCT CAT G		

3.4.6- Gene *GJB5* (Cx31.1)

GenBank, número de acesso: NM005268 - 822pb.

Tabela 9- Seqüência de *primers* para amplificação do gene *GJB5*.

Par	Posição	Primers 5'→3'	Tamanho (pb)	Ta (°C)
1	-132	Cx31.1 1F - CAG CTC CTC TAG TGA TGG TAA	755	58
	623	G Cx31.1 1R - AGG TAG ATG AGC TCC ACG		
2	295	Cx31.1 2F - GAG GTT CAG GAG AAG AGG	682	58
	977	Cx31.1 2R - TTG AGG ACT AGG AAC TGG C		

3.5- Seqüenciamento Automático

Para o seqüenciamento dos genes *GJB2*, *GJB6*, *GJB3*, *GJA1*, *GJB4* e *GJB5* foi utilizado o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (ABI PRISM/PE Biosystems) e o seqüenciador ABI PRISM™ 377 (Perkin-Elmer).

As reações foram constituídas de 40-80ng de DNA, 1 µl do *mix BigDye*, 1µl do *primer* (5mM/µl) *sense* ou *antisense* (os mesmos usados na reação de PCR) e H₂O deionizada para completar 10 µl. As condições de amplificação das reações estão exemplificadas na Figura 9.

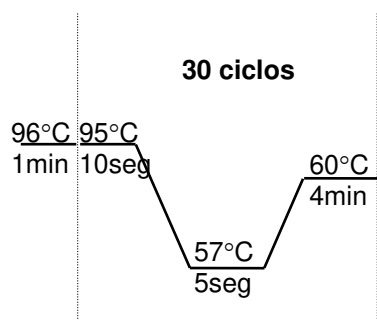


Figura 9- Programa utilizado na reação de seqüenciamento automático.

As amostras foram precipitadas com isopropanol 75% e mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento. Aos 10 µl da reação foram adicionados 80 µl de isopropanol 75%, incubadas por 15 minutos no escuro e centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou 150 µl de etanol 70%. Após centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm descartou-se todo o etanol e as amostras secaram em local escuro à temperatura ambiente.

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

3.6- Confirmação de mutações

As mutações encontradas foram confirmadas por meio de estudos dos familiares, assim como por análise de restrição nos casos em que houve perda ou ganho de um sítio de restrição, ou por seqüenciamento de uma nova reação de PCR.

RESULTADOS

Estudo da mutação A7445G e das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$:

Os resultados obtidos na análise da mutação A7445G no gene $tRNA^{Ser(UCN)}$ e das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ envolvendo o gene *GJB6* são mostrados a seguir.

A Figura 10 mostra a análise de restrição do produto de PCR envolvendo o fragmento do gene que contém a mutação nos pacientes 1 a 15. Todos os indivíduos são negativos para a mutação A7445G.

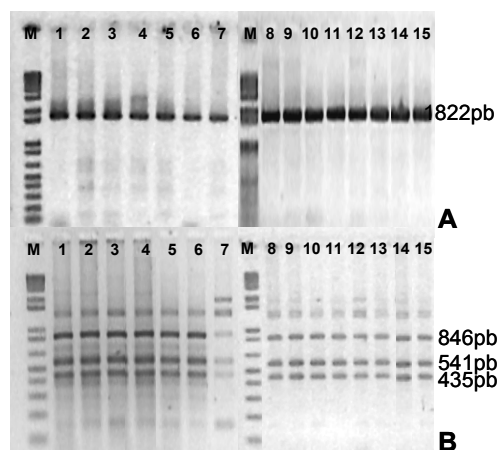


Figura 10- Resultado da análise de restrição da mutação A7445G. **A-** (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (1-15) PCR dos pacientes. **B-** (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (1-15) PCR digerido.

A Figura 11 mostra os resultados obtidos nos 15 pacientes em que foram pesquisadas as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*. Nenhum dos pacientes apresentou qualquer uma das deleções estudadas. A mãe do paciente 7 (7m) foi analisada por também apresentar perda auditiva.

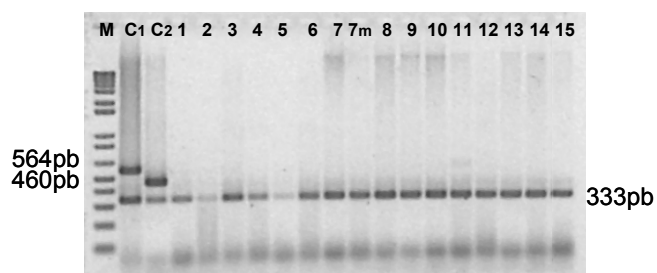


Figura 11- Resultado da análise das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*. (M) marcador de peso molecular 1kb plus, (C₁) controle heterozigoto para a deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$, (C₂) controle heterozigoto para a deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e (1-15) PCR dos pacientes.

Estudo molecular dos genes conexinas:

A Tabela 10 mostra o resumo dos resultados encontrados em cada paciente.

Tabela 10- Genótipos relacionados aos genes *GJB2*, *GJB6*, *GJB3*, *GJA1*, *GJB4* e *GJB5*.

Pacientes	Resultados/Genótipo		Características clínicas
	Gene	Alterações	
01	<i>GJB2</i>	G59S	Síndrome Bart-Pumphrey
	<i>GJB4</i>	E204A	
	<i>GJB5</i>	K138*	
02	<i>GJB3</i>	N119*	Eritrodermia e Perda Auditiva
	<i>GJB5</i>	K138*	
03	<i>GJB5</i>	K138*	Síndrome KID
04	<i>GJB2</i>	R75Q	PPK e Perda Auditiva
	<i>GJB4</i>	H93*	
	<i>GJB5</i>	K138	
05	<i>GJB4</i>	E204A	Eritrodermia congênita
	<i>GJB5</i>	K138*	
06	<i>GJA1</i>	A253V	Eritrodermia Ictiosiforme
07	<i>GJB4</i>	R151S	Eritrodermia Ictiosiforme
08	<i>GJB5</i>	K138*	PPK
09	<i>GJB2</i>	V37I/V27I	Paquioniquia Congênita e Perda Auditiva
	<i>GJB3</i>	R32W	
	<i>GJB4</i>	154delGTCT	
	<i>GJB4</i>	S165*	
	<i>GJB5</i>	K138*	
10	–	–	Eritrodermia Congênita
11	<i>GJB3</i>	V200I	EKV
12	<i>GJB5</i>	K138*	PPK e Perda Auditiva
13	–	–	Síndrome de Clouston
14	<i>GJB2</i>	K168R	Eritrodermia Congênita
15	<i>GJB3</i>	R32W	Hiperceratose Palmoplantar
	<i>GJB4</i>	154delGTCT	

Todas as alterações descritas na Tabela X foram observadas em heterozigose nos pacientes, e as alterações marcadas (*) representam polimorfismos neutros freqüentes na população normal, o que não justifica o fenótipo clínico dos pacientes.

A Figura 12 a seguir mostra a localização de todas as mutações encontradas nos diferentes genes conexinas analisados no presente trabalho.

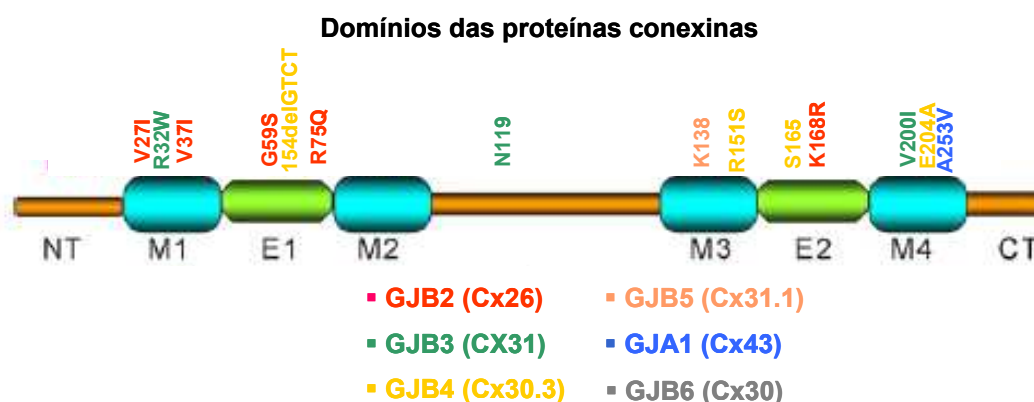


Figura 12- Esquema dos domínios estruturais dos genes conexinas e localização das mutações encontradas (modificado de Richard, 2005).

A análise molecular do paciente 1 mostrou a presença da mutação G59S em heterozigose, caracterizada pela alteração de G para A no nucleotídeo 175 do gene *GJB2* (Figura 13). Esta substituição corresponde à mudança do aminoácido glicina para serina no códon 59.

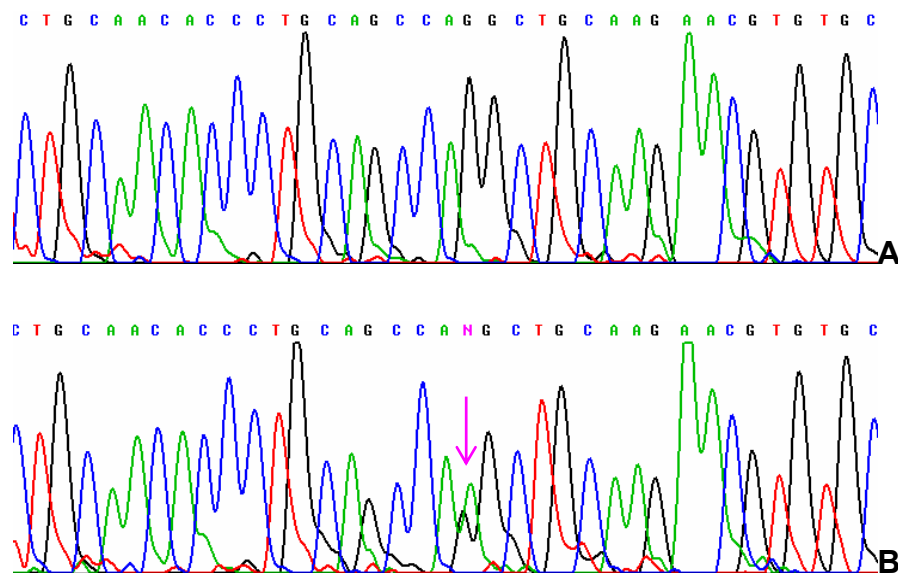


Figura 13- Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene *GJB2*:
A- seqüência normal; **B-** paciente 1 heterozigoto para a mutação G59S (G¹⁷⁵→A).

No gene *GJB4*, ainda no paciente 1 foi encontrada a transversão A→C no nucleotídeo 610 (Figura 14), resultando na mutação E204A (SNP rs3738346). Esta mutação foi também observada no paciente 5, ambos associados com o SNP K138 (rs3738345) no gene *GJB5*, que é muito freqüente na população e na casuística, como mostrou a Tabela 10.

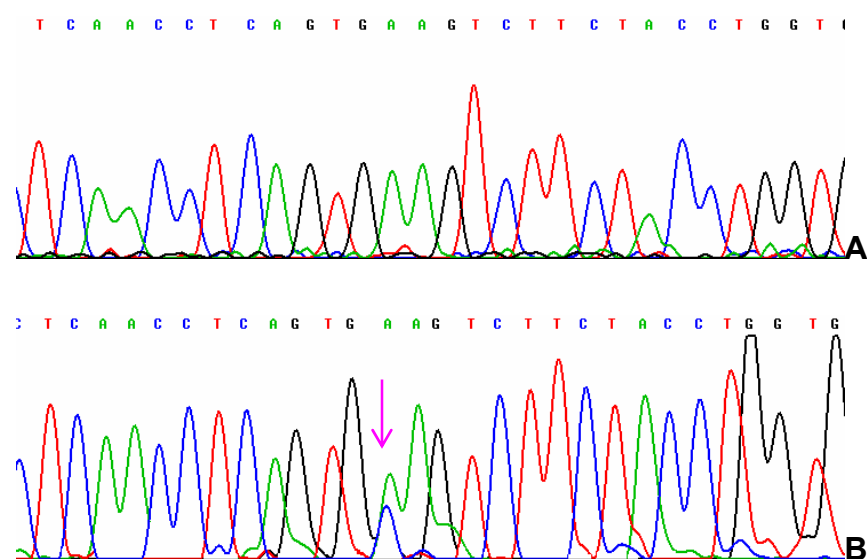


Figura 14- Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene *GJB4*:
A- seqüência normal; **B-** paciente 1 heterozigoto para a mutação E204A (A⁶¹⁰→C).

O paciente 4 apresenta a mutação R75Q no gene *GJB2* em heterozigose, já descrita anteriormente por Uyguner e colaboradores (2002), é responsável pela troca de G para A na posição 224 alterando o aminoácido arginina para glutamina no códon 75 da conexina 26 (Figura 15).

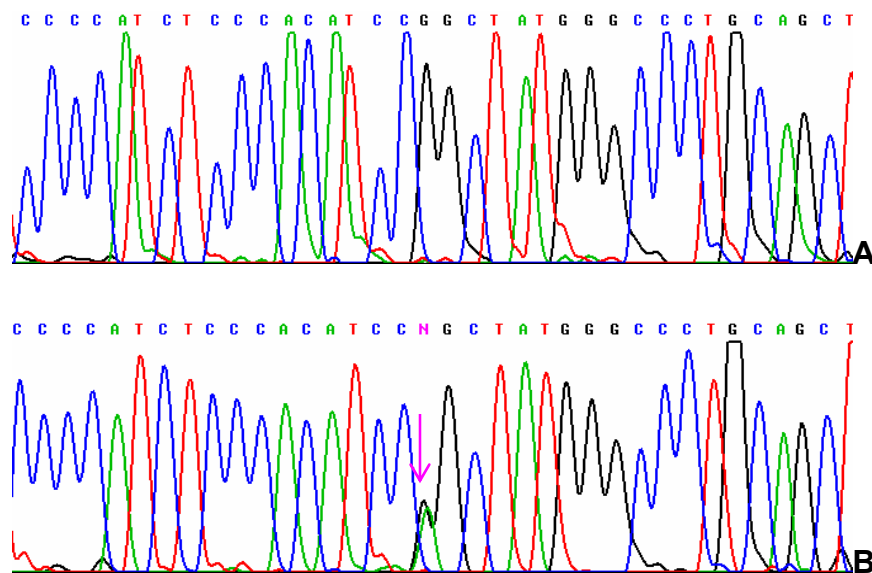


Figura 15- Eletroferograma mostrando parte da sequência do gene *GJB2*:
A- sequência normal; **B-** paciente 4 heterozigoto para a mutação R75Q ($G^{224} \rightarrow A$).

No gene *GJA1* foi observado o SNP A253V no paciente 6 caracterizado pela troca C/T na posição 757 (Figura 16), descrito no banco de dados rs7653265.

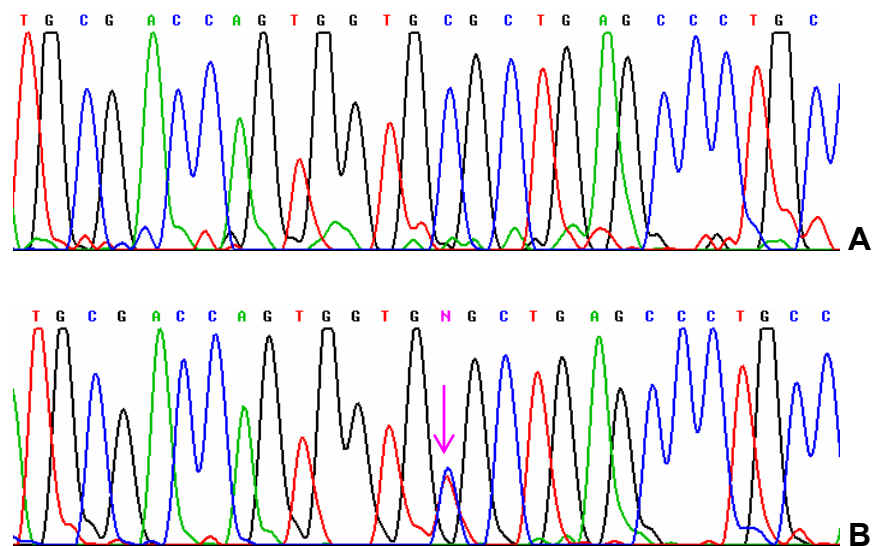


Figura 16- Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene *GJA1*:
A- seqüência normal; **B-** paciente 6 heterozigoto para a alteração A253V ($C^{757} \rightarrow T$).

O paciente 7 apresenta a alteração R151S no gene *GJB4* resultante da troca C/A na posição 451 demonstrada na Figura 17.

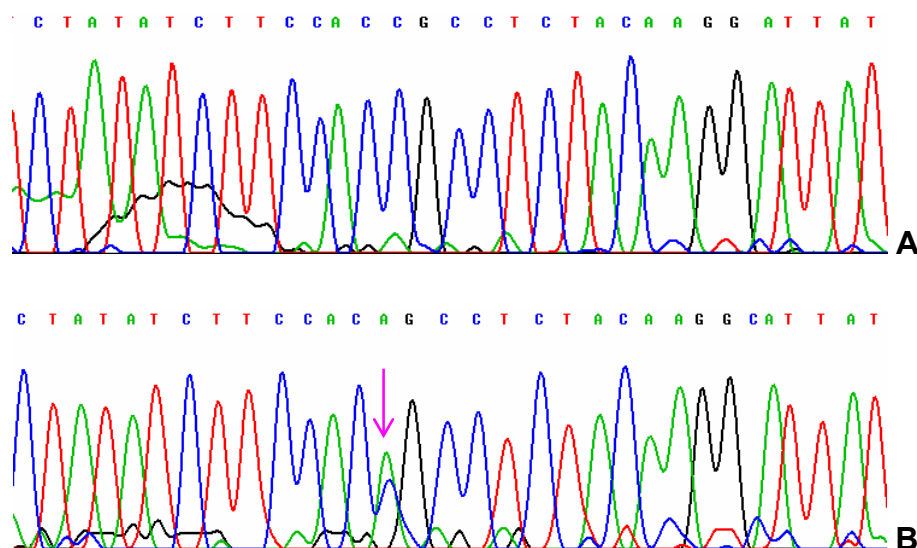


Figura 17- Eletroferograma mostrando parte da sequência do gene *GJB4*:
A- sequência normal; **B-** paciente 7 heterozigoto para a mutação R151S ($C^{451} \rightarrow A$).

O paciente 9 é portador de diversas mutações em diferentes genes conexinas, todas em heterozigose. No gene *GJB2* apresenta a mutação V37I e o polimorfismo V27I. No gene *GJB3* observa-se a presença da mutação R32W. No gene *GJB4* há uma deleção 154del4(GTCT) e o SNP S165, e no gene *GJB5* um outro SNP K138.

As alterações na conexina 26 (*GJB2*) envolvem a conversão do aminoácido valina para isoleucina (Figura 18) no primeiro domínio transmembrânico da proteína (Kelley *et al.*, 1998).

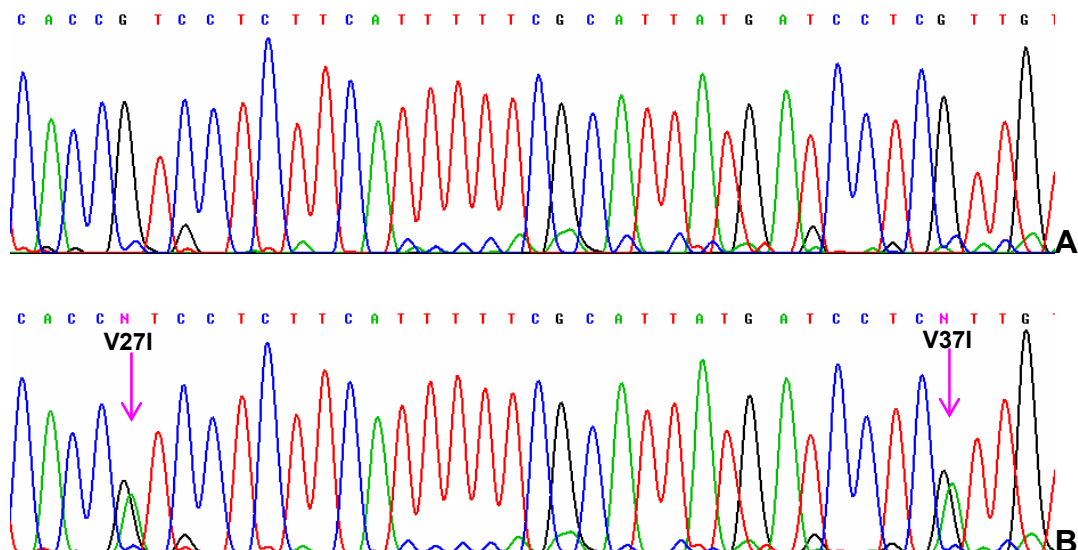


Figura 18- Eletroferograma mostrando parte da sequência do gene *GJB2*: **A-** sequência normal; **B-** paciente 9 heterozigoto para as alterações V27I ($G^{79} \rightarrow A$) e V37I ($G^{109} \rightarrow A$).

A mutação R32W está numa região altamente conservada no primeiro domínio transmembrânico da conexina 31 (*GJB3*), a qual resulta na substituição do aminoácido arginina por triptofano no códon 32 (Figura 19) (Lopez-Bigas *et al.*, 2000).

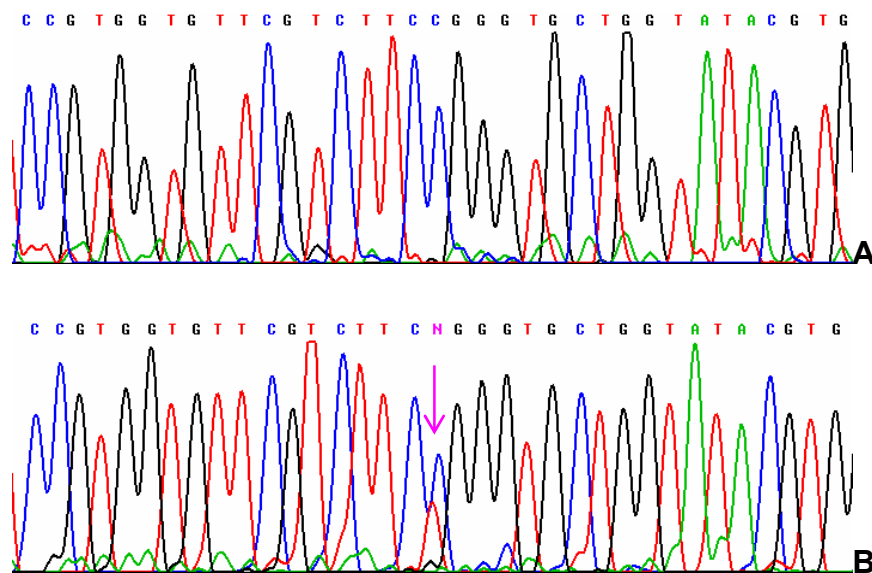


Figura 19- Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene *GJB3*:
A- seqüência normal; **B-** paciente 9 heterozigoto para a mutação R32W (C⁹⁴→T).

A deleção 154del4 no gene *GJB4* resulta na perda de quatro pares de base (GTCT) com alteração na leitura da sequência de aminoácidos seguida de um stop códon (Figura 20).

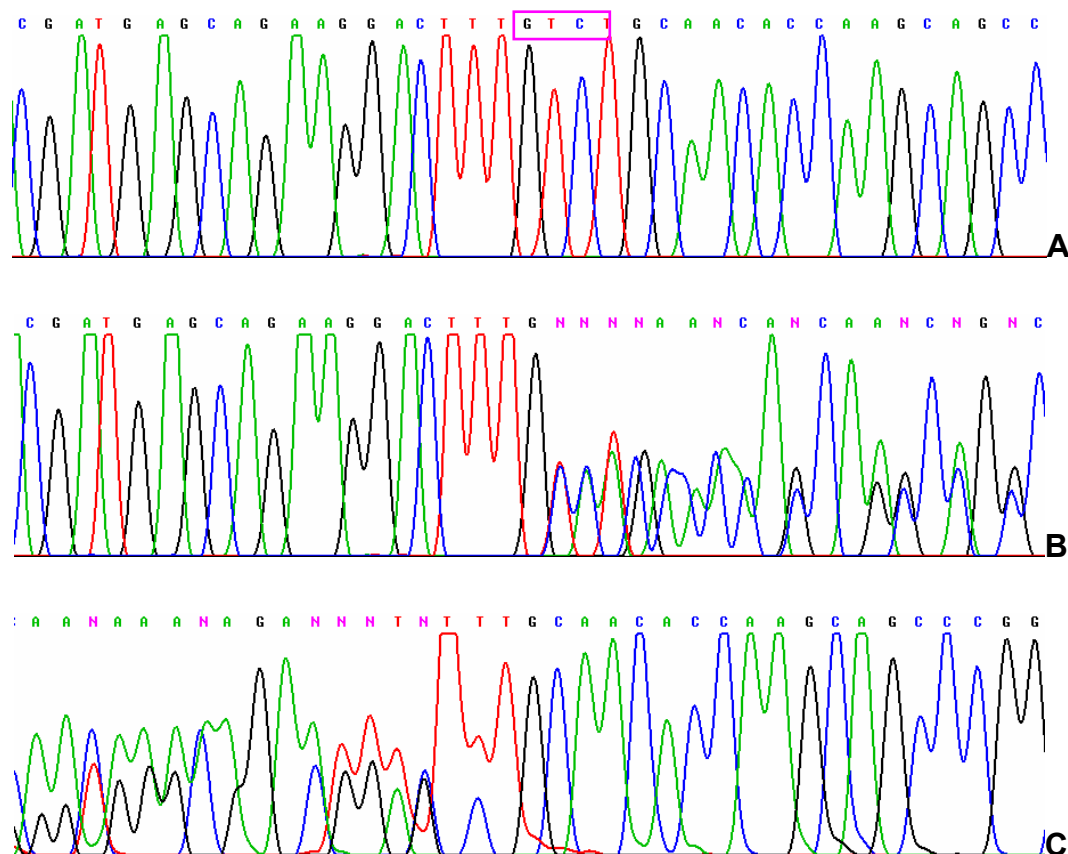


Figura 20- Eletroferograma mostrando parte da sequência do gene *GJB4*:
A- sequência normal; **B-** paciente 9 heterozigoto para a mutação 154del4 (GTCT), fita sense; **C-** paciente 9 heterozigoto para a mutação 154del4 (GTCT), fita antisense.

O paciente 11 apresenta a mutação V200I no gene *GJB3*, resultado da transição G→A na posição 1731, a qual leva a troca do aminoácido valina por isoleucina (Figura 21).

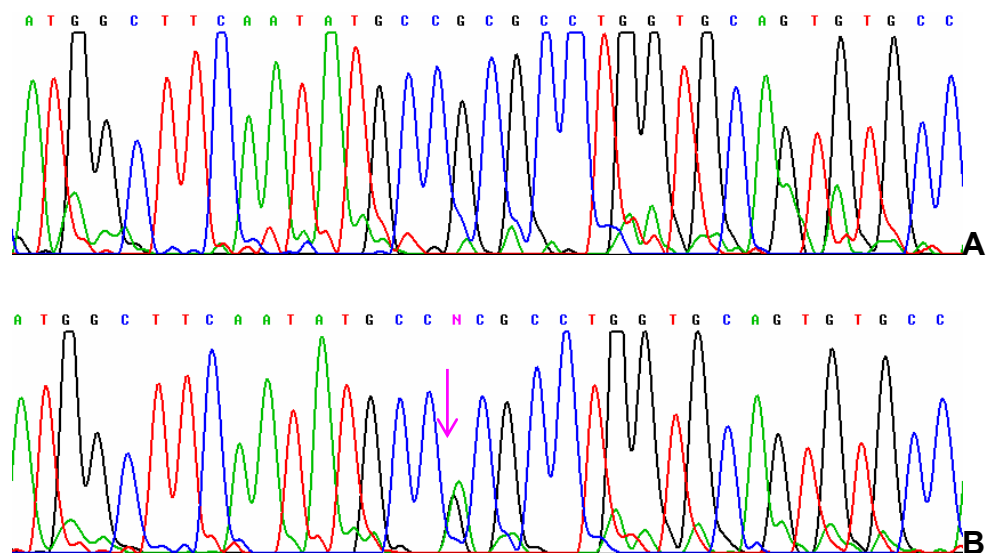


Figura 21- Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene *GJB3*: **A-** seqüência normal; **B-** paciente 11 heterozigoto para a mutação V200I ($G^{1731} \rightarrow A$).

A mutação K168R no gene *GJB2* foi descrita recentemente e o paciente 14 apresenta essa conversão A/G na posição 503 da proteína conexina 26 (Figura 22).

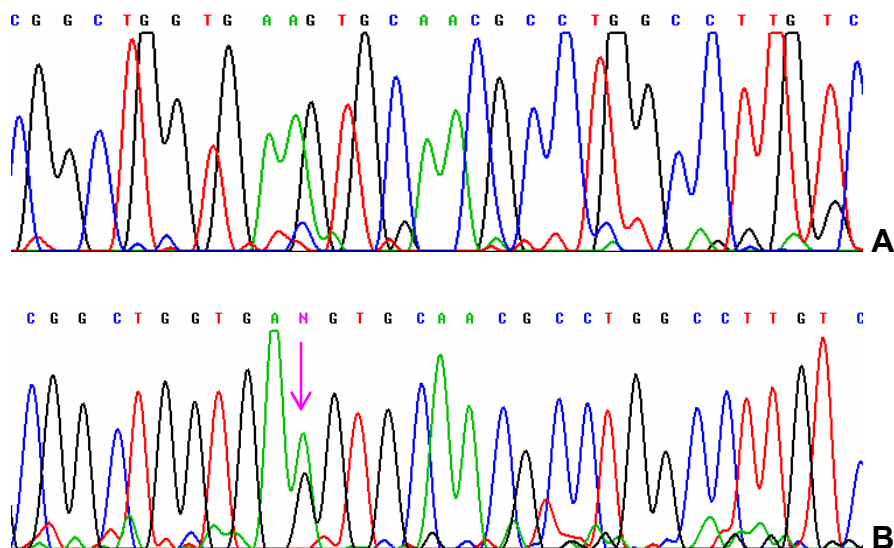


Figura 22- Eletroferograma mostrando parte da sequência do gene *GJB2*:
A- sequência normal; **B-** paciente 14 heterozigoto para a mutação K168R (A⁵⁰³ → G).

DISCUSSÃO

Os genes *GJB2*, *GJB6*, *GJB3*, *GJA1*, *GJB4* e *GJB5* foram analisados em indivíduos portadores de distúrbios de queratinização associados ou não a perda auditiva neurossensorial pelo fato de se expressarem nos tecidos derivados do ectoderma como a epiderme e a cóclea, na tentativa de se correlacionar as mutações nesses genes com as características clínicas do paciente.

As deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ não provocam alterações aparentes no gene *GJB2*, mas resultam no gene *GJB6* defectivo. Estas deleções podem ocorrer tanto em homozigose como em heterozigose juntamente com mutações do *GJB2*, sugerindo possível herança digênica com fenótipo de surdez neurossensorial não-sindrômica. Esta interação dos genes pode ser explicados pela formação dos conéxons heteroméricos. Além disso, foram propostas duas outras hipóteses para esta interação gênica: (1) que estas deleções removeriam elementos *cis* afetando a expressão do gene *GJB2*, (2) efeito cumulativo da remoção e haploinsuficiência do *GJB6* (del Castillo *et al.*, 2005). Entretanto, tais deleções não foram observadas nos casos estudados.

Por sua vez, os fenótipos relacionados a ceratodermia palmoplantar (PPK) com perda auditiva foram associados à mutação A7445G em diferentes famílias de diferentes origens, confirmando que a mutação está claramente envolvida na patogênese dessa característica genética (Martin *et al.*, 2000 e Caria *et al.*, 2005). Os casos descritos até o momento na literatura representam evidências da heterogeneidade genética na associação de PPK com surdez, apesar das características clínicas semelhantes. Essa alteração mitocondrial não foi observada nos casos com fenótipo de PPK estudados no presente trabalho.

Discussão dos casos:

Paciente 1

O paciente 1 é o segundo caso descrito na literatura com suspeita clínica da síndrome de Bart-Pumphrey com surdez e hiperkeratose, associado à mutação autossômica dominante no códon 59 do gene *GJB2* (G59S). A mutação G59S foi rastreada em 100 indivíduos controles, sem perda auditiva e nenhuma alteração dermatológica e todos foram negativos para a devida mutação. Dada a importância desses achados esses dados já foram publicados (Alexandrino *et al.*, 2005).

O códon 59 está localizado do primeiro *loop* extracelular da proteína conexina 26, uma região altamente conservada em todas as conexinas. Este *loop* da proteína reflete um papel importante nas interações entre conéxons, formado por um complexo hexamérico de moléculas de conexina.

Alterações na conexina 26 podem estar envolvidas em muitas formas sindrômicas de surdez e alterações dermatológicas com herança autossômica dominante e, dependendo da mutação envolvida é o que caracteriza o grau de gravidade do fenótipo.

Em 2004, a mutação N54K no gene *GJB2* foi descrita segregando com os membros afetados de uma família com a síndrome de Bart Pumphrey. Esta mutação não foi observada em indivíduos controles, ou seja, indivíduos sem alterações na pele e com audição normal, excluindo a possibilidade da mutação ser um polimorfismo. Para avaliar o efeito *in vivo* da mutação N54K no sistema de *gap junctions* da pele foi realizado uma análise imunohistoquímica das conexinas 26, 30 e 43 nas lesões cutâneas do paciente. Observou-se que N54K resulta na redução da expressão epidermal da conexina 26 e uma superexpressão compensatória da conexina 30 (Richard *et al.*, 2004).

A Figura 23 ilustra esquematicamente a localização das mutações encontradas nos diferentes genes conexinas estudados nesse indivíduo comparando-se com algumas descritas na literatura na mesma região.

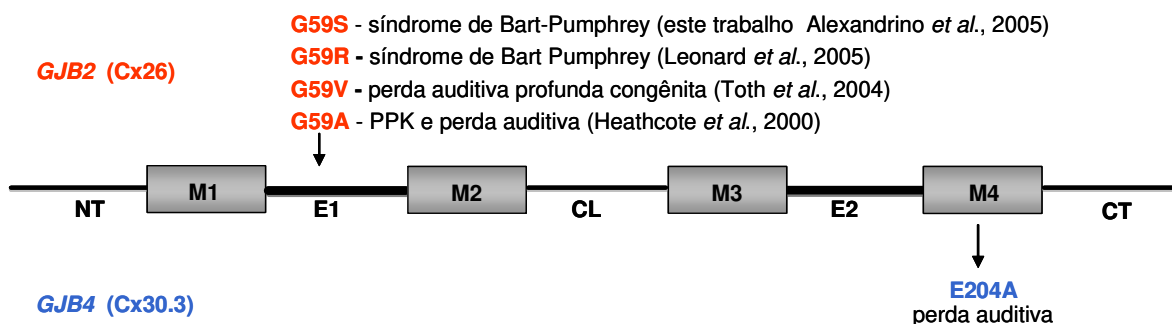


Figura 23- Esquema dos domínios estruturais dos genes conexinas e localização das mutações encontradas no paciente 1.

Interessantemente, como se pode observar na Figura 23 no mesmo códon 59, foram descritas três outras mutações alterando o aminoácido glicina (G). A mutação G59A (glicina para alanina) relacionada à perda auditiva síndrômica e hiperqueratose (Heathcote *et al.*, 2000). A G59R (glicina para arginina), com padrão dominante de herança, descrita como uma variante da síndrome de Bart Pumphrey, com perda auditiva, PPK e *knuckle pad* associado a leucopenia, sendo que nem todos os indivíduos com essa condição apresentam a leucopenia (Leonard *et al.*, 2005). A G59V (glicina para valina) foi descrita em dois membros de uma família, ambos com perda auditiva profunda congênita, sendo que o primeiro não apresenta nenhuma outra mutação e o segundo a mutação G59V está associada a 35delG no gene *GJB2* (Toth *et al.*, 2004). O autor refere que a mutação G59V possa determinar uma herança autossômica recessiva e que fatores adicionais estejam interferindo no fenótipo do primeiro indivíduo.

Nos casos descritos acima, ocorreram mudanças de diferentes aminoácidos na mesma região, o que poderia justificar as diferenças dos fenótipos observados em cada caso. Outra hipótese provável para justificar essa diferença encontrada no paciente estudado nesse estudo e os descritos na literatura poderia

ser a presença da alteração encontrada no gene *GJB4* (E204A). Essa alteração foi previamente descrita por López-Bigas e colaboradores em 2002, e encontrada em um indivíduo com somente perda auditiva, sem apresentar alterações cutâneas.

O espectro clínico de mutações no gene *GJB2* é muito amplo, incluindo várias formas de PPK associadas à perda auditiva neurosensorial, as síndromes de Vohwinkel, Bart Pumphrey e KID. Todas as famílias estudadas até o momento apresentam mutações no primeiro *loop* extracelular da conexina 26, importante na formação dos hemicanais.

Considerando a similaridade de casos dos distúrbios de queratinização, existem relatos de pelo menos três diferentes mutações terem sido descritas na síndrome de KID, a mais comum delas (D50N), onde também foram identificadas em indivíduos com síndrome HID (Richard *et al.*, 2002; van Geel *et al.*, 2002). Essas doenças, até então consideradas entidades distintas podem tratar-se de variantes alélicas de uma mesma síndrome e estando geneticamente relacionadas. Da mesma forma, o paciente deste trabalho com síndrome de Bart Pumphrey e outros indivíduos com PPK mostraram diferentes substituições no mesmo aminoácido glicina no códon 59, no entanto, as síndromes diferem na presença de algumas características como leucopenia e *knuckle pad*. Portanto, as síndromes KID, HID, PPK, BPS e Vohwinkel representam diferentes expressões eventualmente com mesmas mutações no gene *GJB2*.

Paciente 2

No paciente 2, os polimorfismos observados, N119 no gene *GJB3* e K138 no gene *GJB5* são freqüentes na população normal, o que não justifica o fenótipo caracterizado por eritrodermia e perda auditiva profunda. A principal hipótese clínica é de eritrodermia simétrica progressiva e um possível diagnósticos diferencial com psoríase, o que de fato, justifica o fato de não ter sido observada nenhuma alteração molecular significativa.

Paciente 3

Clinicamente o paciente 3 apresenta síndrome de KID, que é uma doença congênita rara causada por mutações transmitidas de forma autossômica dominante no gene *GJB2* (Cx26). As mutações D50N e D50Y, com características fenotípicas semelhantes, são as mais comumente observadas nessa síndrome tanto em casos esporádicos como em casos familiares, confirmando um padrão de herança dominante. Foram ainda descritas outras mutações (G12R, S17F e N14Y) em uma extremidade conservada da conexina. Recentemente, Mazereeuw-Hautier e colaboradores (2007) analisaram o gene *GJB2* em 14 indivíduos com KID para avaliar se há uma correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes na síndrome. Neste estudo, o autor concluiu que os casos familiares parecem mais freqüentes do que descritos na literatura e somente foram observadas as mutações já descritas anteriormente.

No presente estudo, a paciente 3 apresentou somente o polimorfismo K138 no gene *GJB5* e nenhuma outra alteração nos outros genes de conexinas analisados que possam esclarecer o fenótipo desse indivíduo. São necessários outros estudos envolvendo diferentes genes para se tentar correlacionar com as características clínicas observadas.

Paciente 4

O paciente 4 com PPK e hipoacusia, apresenta a mutação R75Q no gene *GJB2*. Esta mutação foi identificada anteriormente como responsável por perda auditiva autossômica dominante associada com PPK, com uma variabilidade fenotípica entre os pacientes, que pode ser devido a fatores genéticos ou ambientais (Feldmann *et al.*, 2005), assim como em uma família turca com a associação entre PPK e surdez (Uyguner *et al.*, 2002).

Nesse mesmo códon, foi também descrita a mutação R75W (arginina para triptofano) em uma família egípcia com surdez autossômica dominante associada a PPK (Richard *et al.*, 1998). Essa mesma mutação também foi relatada

posteriormente em um caso isolado com somente perda auditiva profunda não sindrômica, sem alterações cutâneas (Janecke *et al.*, 2001).

Quando mutações na arginina 75 da conexina 26 foram encontradas em diferentes famílias com perda auditiva autossômica dominante e PPK sugeriu-se que essas alterações fossem suficientes para o desenvolvimento patológico da epiderme. No entanto, há dois casos na literatura onde a mutação na posição 75 da proteína não está envolvida com PPK. O primeiro se refere a um indivíduo controle com característica audiológicas desconhecida (Richard *et al.*, 1998), e o outro, como já mencionado, é uma mutação *de novo* associada com perda auditiva não-sindrômica (Janecke *et al.*, 2001). Piazza e colaboradores (2005), descreveram uma família com perda auditiva com padrão de herança autossômica dominante onde a mutação R75Q não está associada com PPK em nenhum membro da família, sugerindo que a mutação R75Q seja responsável pela perda de audição, mas não desenvolve o fenótipo de ceratites. O autor conclui que a associação de PPK com perda auditiva pode depender do *background* genético sugerindo uma interação funcional entre a conexina 26 mutante com outras conexinas expressas na epiderme.

A mutação R75Q está localizada na interface entre o primeiro *loop* extracelular (E1) e o segundo domínio transmembrânico (TM2) da conexina 26. Todas as mutações na conexina 26, até então identificadas, que causam perda auditiva autossômica dominante e PPK estão localizadas próximas ao *loop* E1 (Uyguner *et al.*, 2002). Portanto, esta região pode ter um papel importante para a função da conexina 26 nos dois tecidos afetados, uma vez que, a arginina na posição 75 é essencial para formar o canal funcional *gap junctional* da conexina 26.

Na avaliação molecular da família 4 observou-se a presença da mutação R75Q no propósito, com perda auditiva associada a PPK. O pai também apresenta a mutação, mas não foi possível examiná-lo, portanto não há relato sobre suas características clínicas.

De acordo com a literatura, a mutação R75Q com herança autossômica dominante, apresenta uma variabilidade genética, onde a associação de PPK com perda auditiva pode realmente depender do *background* genético e como proposto em relatos anteriores pode estar relacionado à interação entre as diferentes conexinas expressas nos tecidos cutâneos.

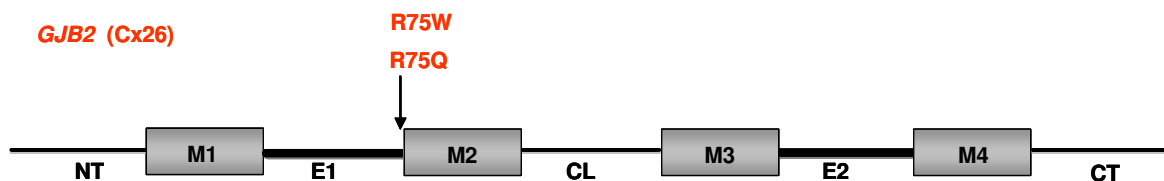


Figura 24- Esquema dos domínios estruturais do gene *GJB2* (Cx26) e localização da mutação das mutações R75Q e R75W.

Além da mutação R75Q, envolvida diretamente com os sinais clínicos do paciente, também estão presentes os polimorfismos H93 no gene *GJB4* e o K138 no gene *GJB5*. Ambos são mutações silenciosas freqüentes na população normal, portanto, provavelmente não estão relacionados ao fenótipo do paciente.

Paciente 5

No paciente 5, o qual apresenta eritrodermia congênita, foram observadas as alterações E204A no gene *GJB4* e o polimorfismo K138 no gene *GJB5*. O indivíduo descrito tem dois irmãos surdos, mas sem a presença da alteração.

A E204A foi descrita por López-Bigas e colaboradores em 2002, em um indivíduo com surdez. Posteriormente, a alteração E204A foi observada em homozigose em um paciente com PPK e surdez condutiva. A surdez condutiva não é causada por mutações em conexinas, já que as mutações estão envolvidas

com perda auditiva neurossensorial. Porém, como a mutação foi observada em homozigose, a PPK pode estar associada com a alteração (E204A) com padrão de herança autossômica recessiva. O alelo E204A somente foi observado na população controle (3/362) em heterozigose, portanto, o autor ainda propõe mais estudos genéticos e clínicos em grandes famílias com EKV para um estudo funcional dessa mutação (Common *et al.*, 2005). No caso do paciente 5, provavelmente a alteração em heterozigose detectada não seja responsável pela eritrodermia congênita. Fatores ainda indeterminados podem estar interferindo no fenótipo observado.

Paciente 6

No paciente 6 observou-se a mutação A253V no gene *GJA1* (Cx43). Apesar dessa mutação ter sido descrita em banco de dados como polimorfismo rs7653265, estudos prévios relatam o envolvimento dessa mutação com a perda de função da conexina 43 e subsequente indução de tumor de células C6 de glioma de rato. Experimentos *in vitro* envolvendo a transfecção do gene *GJA1* defeutivo, ou seja, contendo a mutação A253V no gene *GJA1*, foi suficiente para induzir as células C6 à formação de tumor, fortalecendo a hipótese de que a Cx43 tenha função de supressão de tumor (Omori *et al.*, 1998a; Omori *et al.*, 1998b).

O paciente em questão, apresenta eritrodermia, a qual geralmente está associada a mutações nas conexinas 31 e 30.3. Por outro lado, mutações na conexina 43 têm sido associadas a ODDD (displasia-óculo-dento-digital), uma doença multissistêmica rara (Vitiello *et al.*, 2005). As principais características clínicas de ODDD são dismorfismo facial, microftalmia, glaucoma, anormalidades dentais, oftalmológicas e nas mãos e dedos. Entretanto, recentemente, foram relatados alguns pacientes com anormalidades na epiderme e seus apêndices, tais como, crescimento lento e esparsos de cabelos, deformações de unhas e ceratoderma palmoplantar.

A conexina 43 se expressa por toda camada da epiderme e geralmente sua expressão está associada com diversas manifestações clínicas ligadas a mutações no gene *GJB2*. Entretanto, dada a forte associação de mutações na conexina 43 em enfermidades similares, é possível a relação da mutação A253V como causa do fenótipo do paciente 6. Não foi relatado nenhuma associação das lesões do paciente 6 com algum tipo de câncer, mas o mesmo deverá ser acompanhado pelo ambulatório de Dermatologia do HC (Unicamp).

A perda da comunicação intercelular gap junctions e/ou a disfunção das conexinas são características típicas do desenvolvimento de câncer e está associado com os efeitos de carcinogênese. De fato, muitas neoplasias humanas que se desenvolvem em vários órgãos e em diferentes células, mostram conexinas deficientes mediada principalmente pela localização citoplasmática aberrante dessas proteínas. Os mecanismos pelo quais as conexinas mediam um tumor supressor apresentam efeitos múltiplos, podendo resultar na formação de canais funcionais, hemicanais ou estão diretamente associados com expressão das conexinas. Em adição, a literatura mostra que o desenvolvimento de células cancerígenas pode ser dependente do tipo de célula e do tipo de conexina envolvidos (Pointis *et al.*, 2007).

Previamente, foi demonstrado que a conexina 26 pode aumentar o potencial metastático de células de melanoma em ratos. Saito-Katsuragi e colaboradores (2007) pesquisaram o papel da conexina 26 na metástase de células de melanoma em humanos, focando a comunicação entre células do melanoma com as células endoteliais. O autor observou que a conexina 26 pode contribuir para a metástase do melanoma por facilitar a comunicação entre células do melanoma e as células endotéliais vizinhas.

Muitos outros estudos estão sendo realizados, principalmente envolvendo transfecção *in vitro*, para determinar a participação das conexinas com o desenvolvimento de células malignas que se expressam em diferentes tecidos.

Paciente 7

O paciente 7 apresenta a alteração R151S em heterozigose no gene *GJB4*, a qual foi previamente descrita por Common e colaboradores (2005) como uma alteração com relevância biológica desconhecida em seu estudo clínico e genético sobre EKV. O autor classifica EKV como um grupo heterogêneo de desordens na queratinização.

Clinicamente o paciente apresenta eritrodermia ictiosiforme congênita sem perda de audição, o que poderia sugerir um efeito dominante da mutação. Porém, a mãe da paciente apresenta a mesma mutação, sem nenhuma alteração na pele, mas com perda auditiva profunda.

Em resumo, os dois indivíduos apresentam a mesma alteração porém com uma variação fenotípica entre ambos. Apesar de nenhuma outra mutação ter sido observada, descartando a possibilidade de interação entre duas mutações que justifique quadros clínicos diferentes. Conclui-se que a referida alteração pode estar envolvida com padrão dominante de herança, que apresentam expressividade variável.

Paciente 8

O paciente 8 com PPK apresenta o polimorfismo K138 e nenhuma outra alteração nos outros genes de conexinas analisados. Trata-se de uma mutação silenciosa, portanto, não é nesse caso responsável pelo fenótipo no indivíduo estudado.

Paciente 9

A análise molecular do paciente 9 mostrou algumas alterações em diferentes genes conexinas. Inicialmente observaram-se os genes das conexinas 26 e 31, com as mutações V37I e R32W, respectivamente. A primeira está

envolvida com o fenótipo com padrão recessivo de perda auditiva, uma vez que, foi descrito um indivíduo surdo homozigoto para a mutação V37I, sugerindo que a conversão de valina no códon 37 da conexina 26 seja crítica (Rabionet *et al.*, 2000).

A mutação R32W foi descrita em uma família com ceratodermia palmoplantar (PPK) e diferentes graus de perda auditiva (Kelsell *et al.*, 2000). A análise molecular dessa família identificou as mutações M34T e D66H no gene *GJB2* e a mutação R32W no gene *GJB3*. O alelo D66H segregou com o fenótipo das alterações da pele nos três membros afetados. A M34T somente é responsável pela perda auditiva profunda D66H no mesmo gene *GJB2* ou outro gene envolvido com surdez. A R32W foi considerada contribuir com a severidade da perda auditiva dos pacientes da família e da ceratodermia. No entanto, Lopez-Bigaz (2001), notificou que o alelo R32W representa um polimorfismo neutro, com uma frequência alélica de 7,5% na população espanhola e não que segrega com a perda auditiva em várias famílias. Apesar disso, sugeriu-se que a expressividade da mutação R32W cause surdez genética quando associada a uma segunda mutação em outro alelo do gene *GJB3* ou em outro gene associado com perda auditiva.

A mutação R32W também foi observada em uma família, na qual não há segregação da perda auditiva dos indivíduos. Nessa família o probando com perda auditiva moderada é heterozigoto para a mutação R32W, e possui uma irmã com surdez profunda e alelos normais para essa alteração (Alexandrino *et al.*, 2004). Além disso, Frei e colaboradores (2004) sugerem que a presença da mutação não aumente a gravidade da perda auditiva em associação com mutações na conexina 26. Esses resultados corroboram com os estudos *in vitro* de Rouan e colaboradores (2003), no qual descreve que a expressão de células alteradas (R32W) não difere das células normais, sendo consideradas funcionalmente iguais em relação ao transporte de cálcio entre as células vizinhas. Portanto, serão necessários mais estudos para elucidar se a alteração R32W apresenta um efeito similar *in vivo* ou se pode modular a expressão fenotípica de outras mutações em diferentes conexinas.

A deleção 154del4 no gene *GJB4* foi descrita com uma frequência alélica de 4% em indivíduos normais e surdos. De acordo com alta frequência da mutação, a probabilidade da deleção ser encontrada em homozigose seria de 1/2500. Se a mutação fosse responsável pelo fenótipo de surdez, e considerando que 1/2000 crianças nascem surdas devido a fatores genéticos (Rabionet *et al.*, 2000), 80% dos casos de surdez seriam devido a essa alteração em homozigose. Foi observado um indivíduo homozigoto com perda auditiva (1/555), mas o alelo 154delGTCT não segregou com os outros membros da família (Lopez-Bigas *et al.*, 2002). A alta frequência da deleção na população geral e a presença de indivíduos homozigotos para a mutação indicam a total ausência desse alelo como causa do fenótipo de surdez. Nenhum portador da deleção 154delGTCT foi associado com algum fenótipo de alterações cutâneas. Aparentemente outras conexinas podem compensar a perda ou inativação da conexina 30.3.

Essas duas mutações R32W no gene *GJB3* e 154delGTCT no gene *GJB4* foram encontradas juntas em dois pacientes da casuística desse trabalho (9 e 15). Como discutidas anteriormente as mutações R32W e 154delGTCT não segregam com o fenótipo de perda auditiva, porém uma hipótese provável pode ser que a associação das duas mutações cause algum tipo de alteração na pele. No entanto, os pacientes apresentaram diferentes fenótipos o que pode ser justificado pela associação com outras mutações como observado no paciente 9.

A Figura 25 e a Tabela 11 a seguir resumem os resultados observados no paciente 9 e outros indivíduos da família.

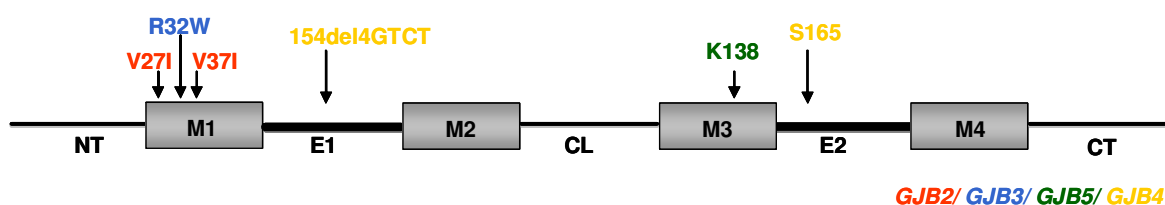


Figura 25- Localização das diferentes mutações nos genes conexinas encontradas no paciente 9.

Tabela 11-Resumo dos resultados da família 9.

Indivíduos	Genótipo	Genes	Fenótipo
1 (Pai)	V37I	<i>GJB2</i>	Normal
	V27I	<i>GJB2</i>	
	R32W	<i>GJB3</i>	
	154del4	<i>GJB4</i>	
2 (Mãe)	S165	<i>GJB4</i>	Normal
	K138	<i>GJB5</i>	
3 (paciente)	V37I	<i>GJB2</i>	Paquioníquia Congênita
	V27I	<i>GJB2</i>	Perda Auditiva
	R32W	<i>GJB3</i>	
	154del4	<i>GJB4</i>	
	S165	<i>GJB4</i>	
4 (irmão)	K138	<i>GJB5</i>	
	V37I	<i>GJB2</i>	Normal
	V27I	<i>GJB2</i>	
	R32W	<i>GJB3</i>	
	154del4	<i>GJB4</i>	
	K138	<i>GJB5</i>	

Conforme mostra o heredograma da Figura 26, as mutações (V37I-*GJB2* e R32W-*GJB3*) e os polimorfismos (V27I-*GJB2* e 154del4-*GJB4*) foram herdados do pai para a paciente e seu irmão, que não justificam suas características clínicas porque o pai e o irmão não apresentam nenhuma anormalidade. Os SNPs (S165-*GJB4* e K138-*GJB5*) são herança materna, onde a paciente apresenta os dois SNPs, mas o irmão apenas o segundo. Portanto, a única diferença do genótipo da paciente com o irmão é a presença do SNP S165. Como discutido anteriormente serão necessários outros estudos para esclarecer se o SNP S165 apresenta alguma interação com as outras mutações descritas, ou ainda estudar outros genes relacionados com distúrbios de queratinização.

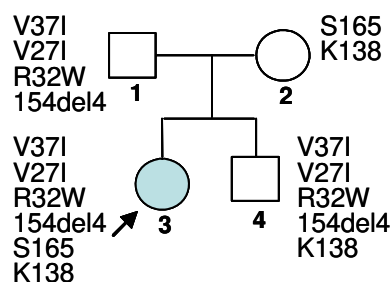


Figura 26- Heredograma da família 9.

Paciente 10

O paciente 10 apresenta eritroceratoderma simétrica progressiva e nenhuma mutação nos genes de conexina analisados. As eritrodermias pertencem a um grupo heterogêneo de anomalias de queratinização. Normalmente, apresentam padrão autossômico dominante de herança, porém, com menos frequência, podem se apresentar com herança autossômica recessiva. A eritrodermia simétrica progressiva aparece na infância e tende a progredir na puberdade. São lesões eritroceratóticas iniciadas de modo discreto e são lentamente acentuadas. As lesões surgem simetricamente, sobretudo na face, orelhas, cotovelos, joelhos e dorso das mãos e dos pés, sendo mais intensas nos membros inferiores. Não há comprometimento palmoplantar (Fonseca e Souza, 1984). Na avaliação molecular do paciente 10 não foi encontrada nenhuma alteração nos genes conexinas estudados.

Paciente 11

O paciente 11 foi clinicamente avaliado com EKV, manifestação clínica bastante heterogênea. O primeiro gene associado a eritrodermias foi o *GJB3* (Richard et al., 1998) e posteriormente o gene *GJB4* (Macari et al., 2000), localizados na região do cromossomo 1p34-p35. Clinicamente as eritrodermias são caracterizadas por placas hiperkeratóticas localizadas por toda superfície e essas manchas são transientes por toda extensão do corpo. Aproximadamente 50% dos pacientes com eritrodermias tem ceratoderma palmoplantar, que são

hiperceratoses nas palmas das mãos e plantas dos pés. A relação genótipo-fenótipo dessa doença sugere que certas mutações podem desenvolver um fenótipo mais grave com hiperceratose generalizada, enquanto que outras, observam-se apenas EKV com placas hiperceratóticas localizadas (Richard *et al.*, 2001; Fonseca e Souza, 1984).

Nesse indivíduo foi observada a mutação V200I no gene *GJB3*. Esta região que está localizada em uma posição não conservada da proteína conexina 31 em diferentes espécies. Na conexina 31 de ratos e camundongos, o aminoácido 200 é uma isoleucina em vez de valina, portanto indica que essa substituição não afeta a propriedade funcional da conexina 31 (López-Brigas *et al.*, 2000).

Como nenhuma outra alteração foi encontrada nos outros genes conexinas, a mutação V200I não justifica o fenótipo do paciente. Todas as mutações descritas no gene *GJB3* envolvidas com EKV substituem aminoácidos conservados entre as β conexinas (Richard *et al.*, 2000). Ao contrário de muitas mutações na conexina 26, que produzem lesões cutâneas, estarem localizadas no primeiro domínio extracelular, as mutações relacionadas à EKV se localizam na extremidade amino terminal e no domínio transmembrânico da conexina 31. Além das conexinas outros genes devem estar envolvidos com EKV, com as queratinas, que são responsáveis pela estratificação do epitélio da epiderme. Aproximadamente 50 genes que codificam queratinas foram identificados nos seres humanos e há um grande número de mutações nesses genes associados com patologias humanas. Portanto, outros genes que se expressam na epiderme devem ser avaliados para elucidar o fenótipo do paciente 11.

Paciente 12

O paciente 12, assim como os pacientes 3 e 8, apresentaram o polimorfismo K138 e nenhuma outra alteração nos outros genes de conexinas analisados. Para esclarecer o fenótipo de cada um desses indivíduos, novos

estudos devem ser realizados, para identificar outros genes envolvidos com o fenótipo desses pacientes.

Clinicamente, o paciente 12 apresenta PPK e perda auditiva. Esta associação clínica está relacionada com as mutações R75Q e R75W no gene *GJB2* com padrão de herança autossômica dominante e com uma grande variabilidade genética, como discutido no paciente 4. Portanto, uma variedade de genes podem estar envolvidos no mecanismo de ação ou expressão dessas mutações associadas com PPK e perda de audição.

Paciente 13

Clinicamente o paciente 13 apresenta a síndrome de Clouston caracterizada por displasia ectodérmica hidrótica, ou seja, hiperqueratose palmoplantar, alopecia, hipoplasia e deformidades nas unhas, hipotricoses. Esses sinais associados à perda auditiva neurosensorial são raros. As anormalidades histopatológicas da pele não são específicas, mas estudos ultra-estruturais de cabelo revelaram uma desorganização das fibras capilares com perda cutícula capilar. A síndrome de Clouston é particularmente comum na população franco-canadense devido a um efeito fundador (Kibar *et al.*, 2000). A síndrome está relacionada com mutações no gene *GJB6* e envolve diferentes fenótipos. Lamartine (2000b) identificou duas mutações distintas a G11R e A88V, que também causam paquioníquia congênita, caracterizada por uma distrofia nas unhas (van Steensel *et al.*, 2002). A mutação V37E está envolvida com as características da síndrome de Clouston, da Síndrome KID.

Foram identificadas duas mutações no gene *GJB6*, as quais segregam com HED em 12 famílias Franco-Canadenses e em outras populações (Lamartine *et al.*, 2000b). A mutação G11R está localizada na extremidade amino-terminal da Cx30, e a mutação A88V encontram-se no segundo domínio transmembrânico. Portanto, mutações no gene *GJB6* estão envolvidas com

diferentes fenótipos e inclusive com perda auditiva autossômica recessiva envolvendo as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ (del Castillo *et al.*, 2005).

Paciente 14

A mutação K168R, observada no paciente 14 com eritrodermia congênita e audição normal, foi descrita recentemente com significância indeterminada em indivíduos com perda auditiva neurossensorial (Samanich *et al.*, 2007 e Oliveira *et al.*, 2007). Samanich descreveu três indivíduos heterozigotos para a alteração, sendo que um deles tem audição normal. O aminoácido lisina na posição 168 é conservado em muitas espécies, porém esta variante também foi encontrada em um indivíduo controle, descartando o possível efeito dominante da mutação.

No resultado do trabalho o paciente e seu irmão apresentam a mutação em heterozigose herdada do pai. Nenhum membro da família relatou perda de audição o que exclui novamente a possibilidade de padrão de herança dominante da mutação associada com surdez. Provavelmente, o paciente 14 apresente outra alteração em outros genes que interagem com a mutação K168R para justificar seu quadro clínico.

Paciente 15

A avaliação molecular do paciente mostrou a associação de duas mutações R32W/154delGTCT nos genes *GJB3* e *GJB4*, respectivamente. Este indivíduo não apresenta nenhuma perda auditiva, somente hiperkeratose palmoplantar. Portanto, a hipótese provável para a associação das mutações é que exista uma interação entre os genes conexinas que faz com que as mutações se expressem em diferentes no tecido epidermal. Para elucidar essa interação

gênica seria necessário um estudo comparativo de expressão das conexinas 31 e 30.3 em indivíduos normais e com as mutações associadas.

A heterogeneidade clínica e genética observada nos distúrbios de queratinização dificulta o diagnóstico clínico e molecular de alguns casos, como é o caso de alguns indivíduos estudados nesse trabalho. Estudos funcionais poderiam ser realizados na tentativa de se correlacionar as mutações aos fenótipos observados, além da busca de novos genes envolvidos. Para tais estudos seria importante a obtenção do mRNA, ou seja, o estudo de genes expressos nas regiões lesionadas dos casos não concluídos. Entretanto, não foi possível se realizar esse tipo de estudo por questões operacionais e éticas.

CONCLUSÕES

Na casuística do trabalho não foi encontrado nenhum caso positivo para as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ ou mesmo para a mutação mitocondrial A7445G. As deleções estão diretamente associadas à perda auditiva não síndrômica com herança autossômica dominante e, a mutação mitocondrial apresenta grande heterogeneidade genética na associação de PPK com surdez.

Foram observados dois casos com mutações autossômicas dominantes no gene *GJB2* (1); e um paciente com herança digênica (2), com mutações nos genes *GJB2* e *GJB3*.

1. As mutações G59S e R75Q foram observadas com padrão de herança autossômica dominante; assim como outras mutações patogênicas no gene *GJB2* estão localizadas na região conservada do primeiro *loop* extracelular (E1) da proteína Cx26. Esse achado reforça a noção de que esse domínio da proteína tem papel fundamental na formação dos hemicanais, na interação dos conéxons e permeabilidade dos canais.

2. As mutações R32W no gene *GJB3* e a 154delGTCT no gene *GJB4* foram observadas nos pacientes 9 e 15. De acordo com esse trabalho e considerando as diversas discussões sobre a relevância biológica dessas mutações, talvez estudos funcionais possam determinar se essas mutações representam polimorfismos ou se há algum efeito modulador na expressão fenotípica quando associadas.

Foi possível estabelecer a causa do fenótipo pelas alterações encontradas nos indivíduos 1 e 4 da casuística que apresentam mutações no gene *GJB2* com padrão de herança autossômica dominante. No entanto, outras mutações foram encontradas nos demais pacientes, supostamente envolvidas nos fenótipos observados, mas não foi possível estabelecer uma classificação molecular das diferentes expressões fenotípicas, pela ausência de estudos funcionais limitados por condições adversas. Novos estudos envolvendo outros genes e outras metodologias laboratoriais serão necessárias para elucidar definitivamente as bases biológicas deste grupo de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandrino F, Sartorato EL, Marques-de-Faria A P, Steiner CE. A G59S mutation in *GJB2* (Connexin 26) gene in a patient with Bart-Pumphrey syndrome. *Am J Med Genet* 2005; 136A: 282-284.

Alexandrino F, Oliveira CA, Reis FC, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Screening for mutations in the *GJB3* gene in Brazilian patients with nonsyndromic deafness. *J Appl Genet* 2004; 45(2): 249-254.

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, De Bruijn MHL, Couson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Sherier PH, Smith AJH, Standen R, Yong IG. Sequence and organization of the mitochondrial genome. *Nature* 1998; 290: 457-465.

Arita K, Akiyama M, Aizawa T, Umetsu Y, Segawa I, Got M, Sawamura D, Demura M, Kawano K, Shimizo H. A novel N14Y mutation in connexin 26 in keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Epithelial and Mesenchymal Cell Biology* 2006; 169(2): 416-423.

Brown CW, Levy ML, Flaitz CM, Reid BS, Manolidis S, Hebert AA, *et al.* A novel *GJB2* (Connexin 26) mutation, F142L, in a patient with unusual mucocutaneous findings and deafness. *J Invest Dermatol* 2003; 121(5): 1221-1223.

Caceres-Rios H, Tamayo-Sanchez L, Duran-Mcfinster C, Dela Luz Orozco M, Ruiz-Maldonado R. Keratitis, ichthyosis, and deafness (KID Syndrome): review of the literature and proposal of a new terminology. *Pediatr Dermatol* 1996; 13: 105-113.

Caria H, Matos T, Oliveira-Soares R, Santos AR, Galhardo I, Soares-Almeida L, Dias O, Andrea M, Correia C, Fialho G. A7445G mtDNA mutation present in a Portuguese family exhibiting hereditary deafness and palmoplantar keratoderma. *J Eur Acad Dermatol Verereol* 2005; 19(4): 455-458.

Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M. Target abkation of connexin 26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 2002; 12: 1106-1111.

Common JEA, O'toole EA, Leigh IM, Thomas A, Griffiths WAD, Venning V, Grabczynska S, Peri Z, Kansky A, Kelsell D. Clinical and genetic heterogeneity of erythrokeratoderma variabilis. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 920-927.

Cowin P and Burke B. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 56-65.

Del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez AA, Hutchin T, Leonardi E, Oliveira C A, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martin Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl H-HM, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith R J H, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, Del Castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-D13S1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005; 42: 588–594.

Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346: 243-249.

Deng Y, Chen Y, Reuss L, Altenberg GA. Mutations of connexin 26 at position 75 and dominant deafness: Essential role of arginine for generation of functional gap-junctional channels. *Hearing Research* 2006; 220: 87-94.

Di WL, Rugg EL, Leigh IM, Kelsell DP. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *Invest Dermatol* 2001; 117: 958-964.

Fear MW, Hatsell SJ, Leigh IM and Kelsell DP. What's new in genodermatoses? *Keio J Med* 2001; 50 (1): 35-38.

Feldmann D, Denoyelle F, Blons H, Lyonnet S, Loundon N, Rouillon I, Hadja-Rabia S, Petit C, Couderc R, Garabédian E. The *GJB2* mutation R75Q can cause nonsyndromic hearing loss DFNA3 or hereditary palmoplantar keratoderma with deafness. *Am J Med Genet* 2005; 137A: 225-227.

Fonseca A e Souza EM. Dermatologia Clínica. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1984; 342-343.

Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nickel R. Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol Neuro-Otol* 2002; 7: 141-145.

Frei K, Ramsebner R, Hamader G, Lucas T, Schoefer C, Baumgartner WD, Wachtler FJ, Kirschhofer K. Lack of association between connexin 31 (*GJB3*) alterations and sensorineural deafness in Austria. *Hearing Reserch* 2004; 198: 81-86.

Gerido DA and White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Bioch Biophy Act* 2004; 1662: 159-170.

Goliger JA, Paul DL. Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37 and Cx43 in developing and mature rat epidermis. *Dev Dyn* 1994; 200(1): 1-13.

Green KJ and Jone JC. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *Faseb J* 1996; 10: 871-881.

Grifa A, Wagner CA, Dámbrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N. Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23: 16-18.

Guan MX, EnriquezJ A, Fischel-Ghodsian N *et al.* The deafness associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5868–5879.

Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis. *J Med Genet* 2000; 37(1): 50-51.

Hennemann H, Dahl E, White JB, Schwarz HJ, Lalley PA, Chang S, Nicholson BJ, Willecke K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J Biol Chemistry* 1992; 267(24): 17225-17233.

Jan AY, Amin S, Ratajezak P, Richard G, Sybert V. Genetic heterogeneity of KID syndrome: Identification of a Cx30 gene (*GJB6*) mutation in a patient with KID syndrome and Congenital Atrichia. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1108-1113.

Janecke AR, Nekan D, Loffler J, Hirst-Stadlmann A, Muller T, Utermann G. De novo mutation of the connexin 26 gene associated with dominant nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Hum Genet* 2001; 108: 269-270.

Kellermayer R, Keller M, Ratajczak P, Richardson E, Harangi F, Mérei E, Melegh H, Kosztolányi G, Richard G. Biogenic connexin mutations in a patient with hidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Dermatol* 2005; 15(2): 75-79.

Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4): 792-99.

Kelsell DP, Di WL, Houseman MJ. Connexin mutations in skin disease and hearing loss. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 559-568.

Kelsell DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM. Connexins mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 141-144.

Kelsell DP and Stevens HP. The palmoplantar keratodermas: much more than palms and soles. *Mol Med Tod* 1999; 3: 107-112.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, *et al.* Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-83.

Kibar Z, Dube MP, Powell J, *et al.* Clouston hidrotic ectodermal dysplasia (HED): genetic homogeneity, presence of a founder effect in the French Canadian population and fine genetic mapping. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 372-380.

Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 1995; 191: 101-118.

Korakimäki T. Intercellular calcium-mediated cell signaling in keratinocytes cultured from patients with NF1 or psoriasis. *Acta Universitatis Ouluensis* 2002.

Laird WD. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006; 394: 527-543.

Lamartine J, Laoudj D, Blanchet-Bardon C, Kibar Z, Soularue P, Ridoux V, *et al.* Refined localization of the gene for clostoun syndrome (hidrotic ectodermal dysplasia) in a large French family. *BrJ Dermatol* 2000a; 142(2): 248-252.

Lamartine J, Munhoz-Essenfelder G, Kibar Z, Lanneluc I, Callouet E, Laoudaj D, *et al.* Mutations in *GJB6* cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 2000b; 26: 142-144.

Lautermann J, Frank H, Jahnke K, Traub O, Winterhager E. Developmental expression patterns of connexin 26 and 30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 1999; 25: 306-311.

Leonard NJ, Krol AL, Bleoo S, Somerville MJ. Sensorineural hearing loss, striate palmoplantar hyperkeratosis, and knuckle pads in a patient with a novel connexin 26 (*GJB2*) mutation. *J Med Genet* 2005; 42: 1-3.

Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, Blanton SH. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 63-67.

López-Bigas N, Melchionda S, Gasparini P, Borragán A, Arbonés ML and Estivill X. A common frameshift mutations and other variants in *GJB4* (connexin 30.3): analysis of hearing impairment families. *Hum Mut* 2002; 19(4): 458-461.

López-Bigas N, Olive M, Rabionet R, Ben-David O, Martinez-Matos JA, Bravo O. Connexin 31 (*GJB3*) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 947-952.

López-Bigas N, Rabionet R, Arbones ML, Estivill X. R32W variant in connexin 31: mutation or polymorphism for deafness and skin disease? *Eur J Hum Genet* 2000; 9: 70.

Macari F, Landau M, Cousin P, Mevorah B, Brenner S, Panizzon R, Schorderet DF, Hohl D, Huber M. Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1296-1301.

Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, Calzolari S, Cambiaghi PM, Saedder A, *et al.* A missense mutation in connexin 26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1237-1243.

Martin L, Toutain A, Guillen C, Haftek M, Machet MC, Toledano C, Arbeille B, Lorette G, Rotig A, Vaillant L. Inherited palmoplantar keratoderma and sensorineural deafness associated with A7445G point mutation in the mitochondrial genome. *Br J Dermatol* 2000; 43(4): 876-883.

Mazerew-Hautier J, Bitoun E, Chevrant-Breton J, Man SY, Bodemer C, Prins C, Antille C, Saurat JH, Atherton D, Harpen JL, Kelsell DP, Hovnanian A. Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: disease expression and spectrum of connexin 26 (GJB2) mutations in 14 patients. *Br J Dermatol* 2007; 156(5): 1015-9.

NCBI Map Viewer. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map>. Acesso em 05 nov. 2007, 15:30.

Oliveira CA, Alexandrino F, Christiani TV, Steiner CE, Cunha JLR, Maciel Guerra AT, Sartorato EL. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet* 2007; 143A: 1574-1579.

Omori Y, Duflot-Dancer A, Mesnil M, Yamasaki H. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects. *Toxicol Lett* 1998a; 97: 105-110.

Omori Y, Yamasaki H. Mutated connexin 43 proteins inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin 43 in a dominant-negative manner. *Int J Cancer* 1998b 78 (4): 446-453.

Oyamada M, Oyamada Y, and Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 6-23.

Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 589-646.

Plantard L, Huber M, Macari F, Meda P, and Hohl D. Molecular interaction of connexin 30.3 and connexin 31 suggests a dominant-negative mechanism associated with erythrokeratoderma variabilis. *Hum Mol Genet* 2003; 12(24): 3287-3294.

Piazza V, Beltramello M, Menniti M, Colao E, Malatesta P, Argento R, Chiarella g, Gallo LV, Catalano M, Perrotti N, Mammano F, Cassandro E. Functional analysis of R75Q mutation in the gene coding for connexin 26 identified in a family with nonsyndromic hearing loss. *Clin Genet* 2005; 68: 161-166.

Pointis G, Fiorini C. Gilleron J, Carette D, Segretain D. Connexin as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacologicas agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem* 2007; 14 (21): 2288-303.

Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding bete connexins. *Hum Mut* 2000; 16(3): 190-202.

Richard G. Connexin disorders of the skin. *Clinics Dermatol* 2005; 23: 23-22.

Richard G, Brown N, Yamamoto AI, and Krol A. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey Syndrome is caused by a novel missense mutation in *GJB2*. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 856-863.

Richard G, Brown K, Rouan F, An Der Schroeoff JG, Bijlsma E, Eichenfield LF, *et al*. Genetic heterogeinity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene *GJB4* (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 601-609.

Richard G, Rouan F, Willoughby CE, Brown N, Chung P, Ruynänen M, *et al*. Missense mutations in *GJB2* encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1341-1348.

Richard G. Connexins disorders of the skin. *Adv Dermatol* 2001; 17: 243-277.

Richard G. Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* 2000; 9: 77-96.

Richard G, Brown N, Smith LE, Terrinoni A, Melino G, Mackie RM, *et al.* The spectrum of mutations in erythrokeratodermias – novel and de novo mutations in *GJB3*. *Hum Genet* 2000; 106: 321-329.

Richard G, White TW, Smith LE, Bailey RA, Compton JG, Paul DL, Bale SJ. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deafmutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 1998a; 103: 393-399.

Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH, DiGiovanna JJ, Compton JG, Bale SJ. Mutations in the human connexin gene *GJB3* cause erythrodermia variabilis. *Nature Genet* 1998; 20: 366-369.

Richard G, Lin JP, Smith L, Whyte YM, Itin P, Wollina V, *et al.* Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity and analysis of candidate genes. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 666-671.

Rouan F, Lo CW, Fertala A, Wahl M, Jost M, Robeck U, Uitto J, Richard G. Divergent effects of two sequence variants of *GJB3* gene (G12D and R32W) on the function of connexin 31 in vitro. *Experimental Dermatol* 2003; 12: 191-197.

Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AV, Lucke TW, Paul DL, *et al.* Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci* 2001; 114: 2105-2113.

Saito-Katsuragi M, Asada H, Niizeki H, Katoh F, Masuzawa M, Tsutsumi M, Kuniyasu H, Ito A, Nojima H, Miyagawa S. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* 2007; 110 (5): 1162-72.

Samanich J, Lowes C, Burk R, Shanske S, Lu J, Shanske A, Morrow BE. Mutations in GJB2, GJB6 and mitochondrial DNA are rare in african american and caribbean hispanic individuals with hearing impairment. Am J Med Genet 2007; 143A: 830-838.

Sevior KB, Hatamochi A, Stewart IA, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, Maw MA. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. Am J Med Genet 1998; 75(2) 179-185.

Smith FJ, Moeley SM, Maclean WH. A novel connexin 30 mutation in Closton Syndrome. J Invest Dermatol 2002; 118: 530-532.

Söhl G and Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovascular Research 2004; 62(2): 228-232.

Thomas T, Telford D, Laird DW. Functional domain mapping and selective trans-dominant effects exhibited by Cx26 disease causing mutations. J Biol Chem 2004; 279(18): 19157-68.

Tóth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, Zenner HP, Muszbek L, Blin N, Pfister M, Sziklai I. GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. Hum Mutat 2004; 23 (6): 631-2.

Uyguner O, Tükel T, Baykal C, Eris H, Emiroglu M, Hafiz G, *et al.* The novel R75Q mutation in the *GJB2* gene causes autosomal dominant hearing loss and palmoplantar keratoderma in a Turkish family. Clin Genet 2002; 62: 306-309.

Van Camp G and Smith R. Hereditary hearing loss homepage. Disponível em: <http://www.crg.es/deafness>. Acesso em 02 out. 2006, 11:21.

Van Geel M, Van Steensel MAM, Küster W, Hennies HC, Happle R, Steijlen PM, *et al.* HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. Brit J Dermatol 2002; 146: 938-942.

Van Steensel MAM, Van Geel M, Nahuys M, Smitt JH, Steijlen PM. A novel connexin 26 mutation in a patient diagnosed with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. J Invest Dermatol 2002; 118: 724-727.

Vitiello C, D'Adamo P, Gentile F, Vingolo EM, Gasparini P, Banfi S. A novel GJA1 mutation causes oculodentodigital dysplasia without syndactyly. *Am J Med Genet* 2005; 133^a: 58-60.

Xia A, Katori Y, Oshima T, Watanabe K, Kikuchi T, Ikeda K. Expression of connexin 30 in the developing mouse cochlea. *Brain Res* 2001; 889: 364-367.

Xia JH, LIU CY, TANG BS, PAN Q, HUANG L, DAI HP. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 20: 370-373.

White TW and Paul DL. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 283-310.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, *et al.* Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383: 725-737.

Yotsumoto S, Hashiguchi T, Chen X, Ohtake N, Tomitaka A, Akamatsu H, *et al.* Novel mutations in *GJB2* encoding connexin-26 in Japanese patients with Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Brit J Dermatol* 2003; 148: 649-653.

Zhang Y, Tang W, Ahmad S, Sipp JA, Chen P, Lin X. Gap junction-mediated intercellular biochemical coupling in cochlear supporting cells is required for normal cochlear functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15201-15206.

ANEXOS

ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

PROJETO:

Estudo Molecular de genes conexinas em pacientes com genodermatoses

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Edi Lúcia Sartorato – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/ CBMEG/ UNICAMP

Fabiana Alexandrino – e-mail: fabianaa@unicamp.br

ENDEREÇO:

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Fone: (19) 3788-1147

e-mail: sartor@unicamp.br

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome:

Registro do Hospital:

Nome do pai:

Nome da mãe:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____, R.G.: _____, entendo que fui convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP envolvendo a avaliação genético-molecular dos indivíduos com genodermatoses associadas ou não à deficiência auditiva. O objetivo desta pesquisa é investigar mutações nos genes conexinas e sua relação com as características clínicas da doença, assim como verificar os níveis de expressão das conexinas envolvidas neste estudo. O sangue e a biopsia de pele colhidos para a avaliação do DNA e do RNA, respectivamente serão preservados durante 5 anos e ao término deste

período, se ainda desejarmos armazenar o material, um novo pedido será submetido ao CEP. Caso houver interesse de realizar um novo projeto de pesquisa com este material, o mesmo será submetido à análise do CEP e um novo consentimento será solicitado. O sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar em participar desse estudo como voluntário, serei submetido à coleta de sangue (5 ml, o equivalente a uma ou duas colheres de sobremesa), não sendo necessária a hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando a amostra de sangue poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta de até 5 anos e após sua realização, essa amostra de sangue será destruída. Como esta doença acompanha alterações na pele, será solicitada uma pequena amostra de pele através de uma biopsia, não sendo necessária à hospitalização. O tecido da biopsia será usado para complementação diagnóstica, sendo preservado durante todo o estudo e destruído depois que ele se completar. As pesquisas laboratoriais utilizando o tecido da biopsia poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta, e após sua realização, essa amostra será destruída. Em todas as amostras coletadas o sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

RISCO E DESCONFORTO:

Para a extração de DNA, serão necessários cerca de 5 ml de sangue venoso, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada da veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado a realizá-la. A biopsia de pele será realizada sob anestesia local e os riscos associados a esse procedimento são mínimos. Os riscos incluem pequeno sangramento no local da biopsia, que não costuma durar mais que alguns minutos e a possibilidade de infecção local (celulite). Há o desconforto devido à aplicação da anestesia local, porém é mínimo, pois o procedimento será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-lo.

VANTAGENS:

Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e que as informações desta pesquisa em relação ao perfil genotípico estarão à minha disposição e que, a pesquisa de alterações nos genes envolvidos em genodermatoses associadas ou não à deficiência auditiva poderá ser fundamental, no diagnóstico da origem dessa doença nos casos em que esta não está esclarecida, permitindo, assim, que o casal seja adequadamente orientado quanto o risco de repetição entre os próximos filhos.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. As responsáveis pela pesquisa, Dra. Edi Lúcia Sartorato fone (19) 3788-1147 e Fabiana Alexandrino fone (19) 3788-1091 estarão disponíveis para responder às minhas questões e preocupações. No caso de dúvidas sobre questões éticas do estudo, poderei ligar para a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, fone (0XX19) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue). Eu reconheço, também, que as responsáveis pela pesquisa podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Nome do participante:

Assinatura do participante:

Nome da testemunha:

Assinatura da testemunha:

ANEXO 2- PARECER COMITÊ ÉTICA - CEP



CEP, 26/07/05.
(Grupo I)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: N° 118/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ANÁLISE MOLECULAR DE GENES CONEXINAS RELACIONADOS À GENODERMATOSES"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Camila Andréa de Oliveira

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 30/03/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/01/06 e 26/07/06

II - OBJETIVOS

Rastrear mutações nos genes GJB2(Cx26), GJB6(Cx30) e GJB3(Cx31) em famílias com recorrência de genodermatoses associadas ou não à deficiência auditiva e nos casos esporádicos de etiologia não esclarecida. Verificar se a expressão das conexinas 26,30,31 está modificada nos indivíduos com genodermatoses associadas ou não a deficiência auditiva.

III - SUMÁRIO

Aproximadamente 10 indivíduos com genodermatoses serão selecionados nos ambulatórios de Genodermatoses e de Dermatologia do HC/UNICAMP, ambulatórios de Genética do CEPRE e Dismorfologia Crânio-Facial da UNICAMP. Serão Utilizados 5ml de sangue e queratinócitos retirados por biópsia de pele. O sangue será destruído em 5 anos e os queratinócitos logo após a coleta dos dados. Do sangue será feita a extração do DNA e análise de mutações 35delG no gene GJB2, e da deleção Δ (GJB6-D13S1830) no gene GJB6 e sequenciamento dos Genes GJB2, GJB6 e GJB3. Dos queratinócitos será extraído o RNA para comprovar expressão das conectinas

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A pesquisa é de interesse científico, tem delineamento metodológico cuidadoso e contempla as determinações éticas, atualmente, em vigor no país, dispondo de profissionais para aconselhamento, orçamento detalhado e termo de consentimento esclarecido adequado para a proposta do estudo.

A pesquisadora responsável acatou a sugestão proposta (esclarecimento do grupo normal) plenamente.

V - PARECER DO CEP

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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005.


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

ANEXO 3- PARECER COMITÊ ÉTICA PARA ALTERAÇÃO DE PESQUISADOR- CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 28/08/07.
PARECER CEP: N° 118/2005

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ANÁLISE MOLECULAR DE GENES CONEXINAS RELACIONADOS
'A GENODERMATOSES"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Camila Andréa de Oliveira

II- PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o pesquisador responsável por Fabiana Alexandrino, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de agosto de 2007.


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

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

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

Página 1 de 1

Research Letter**G59S Mutation in the *GJB2* (Connexin 26) Gene in a Patient With Bart–Pumphrey Syndrome****To the Editor:**

The connexins are a family of proteins whose major function is as part of the gap junctions of cell-to-cell channels. They are expressed in several tissues including brain, skin, and cochlea. Mutations in connexins play a major role in nonsyndromic deafness, but have been also described in individuals with variable dermatological features [Kelsell et al., 2001].

Initially, the connexin 26 (*GJB2*) gene was implicated in autosomal recessive forms of hearing loss, but was later found to be involved in both recessive and dominant forms of genetic deafness [Chaib et al., 1994; Petit et al., 2001]. The most common mutation associated with recessive deafness is 35delG within the *GJB2* gene [Denoyelle et al., 1997], which accounts for up to 70% of the connexin 26 mutations observed in European and American Caucasian populations [Green et al., 1999; Gasparini et al., 2000]. In addition, there are other mutations such as nonsense mutations, deletions, and insertions within the *GJB2* gene that result in hearing loss.

Heterozygous missense mutations in *GJB2* were found in several conditions associating deafness and hyperkeratosis: D66H in mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome, OMIM 124500) [Maestrini et al., 2002], G59A and R75Q in palmoplantar hyperkeratosis with deafness (PPKD, OMIM 148350) [Heathcote et al., 2000; Uyguner et al., 2002], as well as D50Y and D50N in keratitis-ichthyosis-deafness syndrome (KID, OMIM 148210), and in hystrix-like-ichthyosis-deafness syndrome (HID, OMIM 602540) [Richard et al., 2002; van Geel et al., 2002; Yotsumoto et al., 2003]. Richard et al. [2002] also described two sporadic cases of KID syndrome with G12R and S17F missense mutations, each patient showing a different mutation.

GJB2 is contiguous to another connexin gene, *GJB6*, which encodes connexin 30. Together they form the DFBN1 locus. Large deletions in *GJB6* extending to the *GJB2* gene may result in a monogenic or digenic pattern of prelingual deafness. Missense mutations in the *GJB6* gene cause hidrotic ectodermal dysplasia (Clouston syndrome), an autosomal dominant disorder characterized by hair and nail defects, palmoplantar hyperkeratosis, and other variable findings.

Mutations in the *GJB3* (connexin 31) gene also cause both autosomal recessive and autosomal dominant forms of nonsyndromic deafness, as well as erythrokeratoderma variabilis, an autosomal dominant genodermatosis with variable clinical presentation including hyperkeratosis.

Bart–Pumphrey syndrome (BPS, OMIM 149200) is a rare autosomal dominant disorder characterized by congenital deafness, palmoplantar hyperkeratosis, knuckle pads, and leukonychia. To date, only a few families with this disorder have been reported [Schwann, 1963; Bart and Pumphrey, 1967; Crosby and Vidurizaga, 1976; Ramer et al., 1994; Oliveira et al., 2003]. Richard et al. [2004] recently reported BPS mutation.

We present here a 26-year-old male patient with BPS who was submitted to molecular analysis of the connexin 26, 30, and 31 genes. He presented with congenital sensorineural deafness. Verrucous-like nodes on the interphalangeal, metacarpophalangeal, and metatarsophalangeal joints of the dorsa of the hands and feet (knuckle pads, Fig. 1) as well as palmoplantar hyperkeratosis started at age 3 years. Nail shape and size were normal, and no leukonychia was observed. Anthropometrical data were within normal ranges and no signs of cognitive impairment were detected. An audiogram and a brainstem evoked response audiometry (BERA) were performed, both showing severe sensorineural hearing loss. His father showed a similar phenotype. Clinical presentation and histologic findings of this family were previously reported by Oliveira et al. [2003].

Since the father was not willing to participate in molecular studies, blood specimens were collected only from the proband with approval by the appropriate institutional review board and informed consent of the subject.

DNA samples were extracted from whole blood by standard techniques. The *GJB2* gene was PCR amplified using the two pairs of primers [Denoyelle et al., 1997; Kelsell et al., 1997], and *GJB3* gene was amplified using five pairs of primers described elsewhere [Xia et al., 1998]. For mutation analysis, the single coding regions of the *GJB2* and *GJB3* genes were sequenced from PCR products using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM/PE Biosystems, Foster City, CA) and the products resolved on ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer, Boston, MA).

In order to examine the deletion of the *GJB6* gene, we amplified the breakpoint junction of the (*GJB6*-D13S1830)del by PCR [del Castillo et al., 2002].

Analysis and sequencing of *GJB3* did not show any abnormality and the (*GJB6*-D13S1830)del in the *GJB6* gene was not found. However, sequencing of *GJB2* revealed a G to A substitution at nucleotide 175. This nucleotide substitution corresponds to a heterozygous glycine to serine change at codon 59 (G59S) (Fig. 2). This amino acid substitution was not found in more than 200 individuals with isolated deafness and in over 100 individuals without hearing loss tested in our service. This substitution was also not listed in the Human Gene Mutation Database [2004].

A mutation in the same codon (59) was reported by Heathcote et al. [2000] who proposed that G59A was responsible for the syndrome of hearing loss and hyperkeratosis observed in their study. This codon is located in the first extracellular loop (E1) of connexin 26 (Fig. 3), a region that is highly conserved among all connexins sequenced to date.

Most syndromic forms of deafness-hyperkeratosis are associated with mutations in the first extracellular domain of

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*Correspondence to: Carlos Eduardo Steiner, Departamento de Genética Médica, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13081-970 Campinas, São Paulo, Brazil.
E-mail: steiner@fcm.unicamp.br

Received 28 May 2004; Accepted 18 April 2005

DOI 10.1002/ajmg.a.30822

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

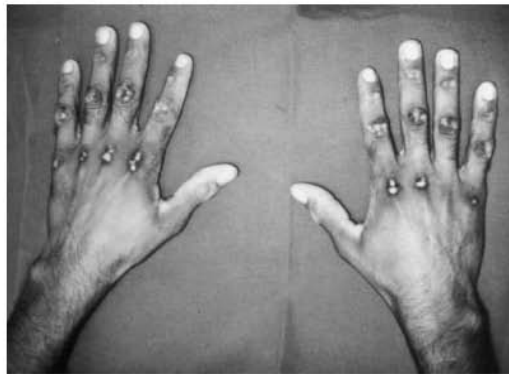


Fig. 1 Dorsal view of prepositus' hands showing knuckle pads.

connexin 26. Three unrelated families with Vohwinkel syndrome showed the same mutation [Maestrini et al., 2002], although variable intra- and interfamilial degrees of dermatological and audiological features were present, as well as worsening with age. At least three different mutations have been described in KID syndrome; the most common of these was recently identified in individuals with HID syndrome [Richard et al., 2002; van Geel et al., 2002], until then considered a distinct entity from the former. The present patient with BPS and one individual with PPKD [Heathcote et al., 2000] showed different replacements in same amino acid: glycine at codon 59. BPS differs from PPKD by the presence of leukonychia and knuckle pads (Fig. 1), although two among five individuals described by Ramer et al. [1994] as having BPS did not have ungual changes.

Each connexon is a hexameric complex of connexin molecules and the first extracellular loop of the protein is thought to play a role in connexon–connexon interactions. Richard et al. [2002] suggested that specific amino acid substitutions within the extracellular domain E1 of connexin 26 may affect only the epithelium of the cochlea, the inner ear and epidermis or the corneal epithelium, hair follicles, and nails. Thus, connexin 26 may be involved in many of the autosomal dominant syndromes of deafness with dermatological changes and the severity of the phenotype may be dependent upon the mutation involved.

In conclusion, this is the second report indicating that BPS joins the list of deafness–hyperkeratosis conditions associated with mutations in *GJB2* gene. The data regarding whether specific mutations are responsible for each clinical presentation are limited at present, but it appears that KID, HID, PPKD, BPS, and Vohwinkel syndrome represent different expressions of a single gene defect.

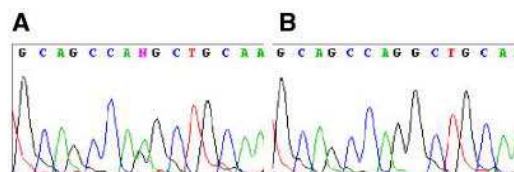


Fig. 2 Direct sequencing analysis of the coding region of the *GJB2* gene illustrating the G59S alteration. A: AG → A transition of one allele. B: Wild-type sequence. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

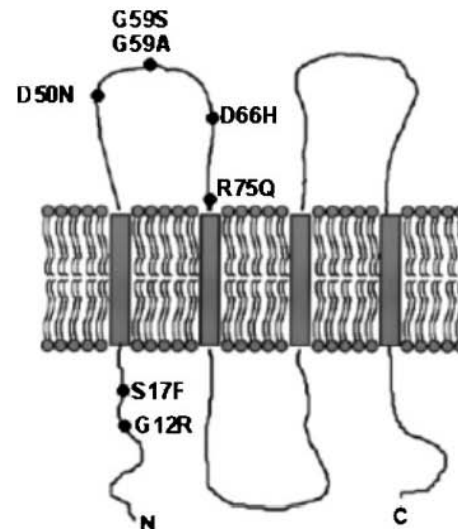


Fig. 3 Schematic of connexin 26 protein structure indicating mutations associated with deafness and hyperkeratosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The Authors thank Dr. Gabriele Richard for helpful suggestions.

REFERENCES

- Bart RS, Pumphrey RE. 1987. Knuckle pads, leukonychia and deafness—a dominant inherited syndrome. *New Engl J Med* 276:202–207.
- Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P, Planchu H, Levilliers J, Morgan A, Petit C. 1994. A gene responsible for a dominant form of nonsensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum Mol Genet* 3:2219–2222.
- Crosby EP, Vidurizaga RH. 1976. Knuckle pads, leukonychia, deafness and keratosis palmoplantaris. Report of a second family. *Johns Hopkins Med J* 139:90–92.
- del Castillo I, Vilamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Álvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346:243–249.
- Denoyelle P, Wail D, Maw MA, Wilcox AS, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Baulieu-Elgaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El Zir E, Aubeis A, Joannard A, Petit C. 1997. Prelingual deafness: High prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6:2173–2177.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 8(1):19–23.
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJH. 1999. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 281:2211–2216.
- Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton NA. 2000. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J Med Genet* 37:50–51.
- Human Gene Mutation Database. 2004. Nucleotide substitutions (missense/nonsense) in GJB2. Available at <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/ns/1/125247.html> (accessed at 11/04/2004 GMT+2).

- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. 1997. Connexin 26 mutations in hearing non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387:80–83.
- Kelsell DP, Di WL, Houseman MJ. 2001. Connexin mutations in skin diseases and hearing loss. *Am J Hum Genet* 68(3):559–568.
- Maestrini E, Korge BP, Ocaña-Sierra J, Calzolari E, Cambiaghi S, Scudder PM, Hovnanian A, Monaco AP, Munro CS. 2002. A missense mutation in connexin 26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Molec Genet* 8:1237–1243.
- Oliveira GV, Steiner CE, Cintra ML, Marques-de-Faria AP. 2003. Deafness, palmoplantar hyperkeratosis, and knuckle pads with male-to-male transmission: Bart–Pumphrey syndrome. *Genet Mol Biol* 26:129–131.
- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35:589–646.
- Ramer JC, Vasily DB, Ladda RL. 1994. Familial leukonychia, knuckle pads, hearing loss, and palmoplantar hyperkeratosis: An additional family with Bart–Pumphrey syndrome. *J Med Genet* 31:68–71.
- Richard G, Rouan F, Willoughby CE, Brown N, Chung P, Ryyänen M, Jabs EW, Bale S, DiGiovanna JJ, Uitto J, Russell L. 2002. Missense mutation in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrome. *Am J Med Genet* 70:1341–1348.
- Richard G, Brown N, Ishida-Yamamoto A, Krol A. 2004. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart–Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J Invest Dermatol* 123: 856–863.
- Schwann J. 1963. Keratosis palmaris et plantaris cum surditate congenita et leukonychia totali unguium. *Dermatologica* 126:335–353.
- Uyguner O, Tükel T, Baykal C, Eris H, Emiroglu M, Hafiz G, Ghanbari A, Baerer N, Yksel-Apak M, Wollnik B. 2002. The novel R75Q mutation in the GJB2 gene causes autosomal dominant hearing loss and palmoplantar keratoderma in a Turkish family. *Clin Genet* 62:306–309.
- van Geel M, van Steensel MAM, Küster W, Hennies HC, Happle R, Steijlen PM, König A. 2002. HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. *Br J Dermatol* 146:938–942.
- Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, Zhang BR, Xie W, Hu DX, Zhen D, Shi XL, Wang D, Xia K, Yu KP, Liao XD, Feng Y, Yang YF, Xiao JY, Xie DH, Huang JZ. 1998. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 20:370–373.
- Yotsumoto S, Hashiguchi T, Chen X, Ohtake N, Tomitaka A, Akamatsu H, Matsunaga K, Shiraishi S, Miura H, Adachi J, Kanzaki T. 2003. Novel mutations in GJB2 encoding connexin-26 in Japanese patients with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br J Dermatol* 148:649–653.

Fabiana Alexandrino

Edi Lúcia Sartorato

Centro de Biologia Molecular e Engenharia
Genética (CBMEG)
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
Campinas, São Paulo, Brazil

Antonia Paula Marques-de-Faria

Carlos Eduardo Steiner*

Departamento de Genética Médica
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
Campinas, São Paulo, Brazil

ANEXO 5- ARTIGO SUBMETIDO

American Journal of Medical Genetics: Part A



American Journal of
Medical Genetics
Part A

Connexin mutations in Brazilian patients with deafness and skin disorders

Journal:	<i>American Journal of Medical Genetics: Part A</i>
Manuscript ID:	07-0944
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	26-Dec-2007
Complete List of Authors:	Alexandrino, Fabiana; Unicamp, CBMEG Oliveira, Camila; Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/ CBMEG <input type="checkbox"/> Laboratório de Genética Molecular Humana <input type="checkbox"/> UNICAMP Magalhães, Renata; Departamento de Clínica Médica <input type="checkbox"/> Disciplina de Dermatologia Clínica <input type="checkbox"/> UNICAMP Souza, Elemir; Departamento de Clínica Médica <input type="checkbox"/> Disciplina de Dermatologia Clínica <input type="checkbox"/> UNICAMP Sartorato, Edi; Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/ CBMEG <input type="checkbox"/> Laboratório de Genética Molecular Humana <input type="checkbox"/> UNICAMP
Keywords:	connexins, deafness, skin diseases



John Wiley & Sons, Inc.

