



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LAURA LISIEUX DOS SANTOS MONTEIRO

**ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS AO GENE *COL7A1* NA
EPIDERMÓLISE BOLHOSA DISTRÓFICA (EBD)**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado no formato de artigo
científico ao UniCEUB como requisito
parcial para a conclusão do curso de
Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Professor Dr. Paulo
Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA

2016

Análise molecular de mutações associadas ao gene *COL7A1* na Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD)

LAURA LISIEUX DOS SANTOS MONTEIRO*

PAULO ROBERTO MARTINS QUEIROZ**

Resumo

A Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD) é o tipo mais grave clinicamente dentre o grupo das Epidermólises Bolhosas. É subdividida em quatro subtipos, dois dominantes (EBDD) e dois recessivos (EBDR), todos provocados por mutações no gene *COL7A1*, que codifica para o colágeno tipo VII. O objetivo deste trabalho foi associar os principais tipos de mutações com a estrutura molecular da proteína COL7A1 relacionado aos fenótipos da EBD. Como metodologia, foi realizado um estudo experimental em três etapas que consistiram na revisão bibliográfica de artigos científicos sobre a EBD, processamento das informações obtidas em programas de bioinformática e elaboração dos resultados. Os fenótipos da EBD variam de acordo com o tipo de mutação (*nonsense*, *missense*, deleção, inserção ou mutação *indel*) que ocorreu na sequência gênica e sua localização. Mutações do tipo *missense* estão geralmente relacionadas à EBDD enquanto que os outros tipos descritos associam-se aos perfis fenotípicos da EBDR.

Palavras-chave: Epidermólise Bolhosa Distrófica, mutações, *COL7A1*, colágeno tipo VII, bioinformática.

Molecular analysis of mutations associated with *COL7A1* gene in the Dystrophic Epidermolysis Bullosa (DEB)

Abstract

The Dystrophic Epidermolysis Bullosa (DEB) is the most serious type clinically from the group of Epidermolysis Bullosa. It is subdivided in four subtypes, two dominants (DDEB) and two recessives (RDEB), all caused by mutations in the *COL7A1* gene that encoding for collagen type VII. The objective of this study was to associate the major types of mutations with the molecular structure of the COL7A1 protein related to phenotypes of DEB. As methodology, an experimental study was accomplished in three stages that consisted in the review of scientific articles about the DEB, processing of the information obtained in bioinformatics programs and preparation of the results. The phenotypes of DEB vary according with the type of mutation (*nonsense*, *missense*, deletion, insertion or *indel* mutation) has occurred in the gene sequence and its location. *Missense* mutations are generally related with DDEB while the other types described are associated with phenotypic profiles of RDEB.

Keywords: Dystrophic Epidermolysis Bullosa, mutations, *COL7A1*, collagen type VII, bioinformatic.

*Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB. lau.lisieux@gmail.com

**Biólogo. Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília (2006). paulo.silva@uniceub.br

1. Introdução

A Epidermólise Bolhosa (EB) constitui um grupo de enfermidades hereditárias caracterizadas por defeitos na adesão intraepidérmica ou dermo-epidérmica que resultam no surgimento de bolhas na pele em resposta ao menor trauma sofrido (ALMEIDA JR, 2002). As EB's se dispõem em quatro tipos que são classificados de acordo com a histologia e formação das bolhas: EB Simples, EB Juncional, EB Distrófica e a Síndrome de Kindler, grupo incluído recentemente no terceiro consenso internacional de EB (BOEIRA, 2012).

Com relação à epidemiologia da EB, vários estudos foram feitos estimando a incidência e a prevalência da doença com diferentes técnicas realizadas, mas as pesquisas mais importantes e tidas como referência são as derivadas do Registro Nacional de EB nos Estados Unidos (BOEIRA, 2012). Segundo os EUA, ocorrem 50 casos de EB por um milhão de nascidos-vivos, sendo 92% na forma EB simples, 5% na forma distrófica, 1% na forma juncional e 2% não classificados. No Brasil não há dados epidemiológicos, pois ainda estão sendo realizados estudos sobre o número de indivíduos afetados pela Epidermólise Bolhosa. A EB afeta ambos os gêneros e pode ocorrer em todas as etnias (GÜRTLER; DINIZ; FILHO, 2005).

A Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD) é o tipo menos comum e mais grave dentre as EB's. Ela se subdivide em quatro subtipos principais, dois na forma autossômica dominante e dois na forma autossômica recessiva (OLIVEIRA, et al., 2010). Os subtipos da EBD dominante (EBDD) são: *Cockayne-Touraine* (EBDD-CT), que tem como características clínicas a formação de bolhas nas extremidades do corpo, cavidade oral (mucosas e dentes) e distrofia ou ausência de unhas; e o subtipo *Pasini* (EBDD-Pa), com as mesmas manifestações clínicas que a EBDD-CT, mas de forma mais grave, com formação de bolhas mais extensas, semelhantes à pápulas, surgindo também na região do tronco. Os subtipos de EBD recessivo (EBDR) costumam ser mais agressivos (ALMEIDA JR, 2002). A forma recessiva *não-Hallopeau-Siemens* (EBDR-nHS) é mais grave que os subtipos dominantes e também tem como clínica o desenvolvimento de bolhas nas extremidades do corpo e perda das unhas, mas com pouco envolvimento das mucosas. Já a forma recessiva *Hallopeau-Siemens* (EBDR-HS) é a mais severa do grupo EBD. Suas manifestações clínicas compreendem a formação de bolhas com distribuição generalizada pelo corpo; pseudosindactalia (deformidade das mãos e pés em forma de “luva de box”), unhas e dentes extremamente afetados com perdas; envolvimento das mucosas internas com restrições no esôfago, estenose (estreitamento) anal e uretral; fimose; escaras na córnea; anemia ferropriva e déficit de desenvolvimento

ocasionados por desnutrição. Além disso, estes pacientes possuem sério risco de desenvolvimento de câncer de pele nos locais de lesões crônicas (BARROS; RASKIN; PEREIRA-FERRARI, 2004; BOEIRA, 2012).

Todos os subtipos de EBD, dominantes e recessivos, são provenientes de mutações em um mesmo gene, o *COL7A1*. Porém, o que determina cada subtipo são a localização e o tipo da mutação que ocorre neste gene. O *COL7A1* codifica o colágeno tipo VII, importante proteína que compõe as fibrilas de ancoragem que participam da adesão entre a lâmina densa e a derme na pele (DANG; MURRELL, 2008).

Para a EBD já foram descritas mais de 730 mutações que levam a diferentes fenótipos da doença. Dentre essas mutações, os tipos mais comuns são: mutações que codificam para um aminoácido diferente (*missense*); mutações sem sentido, que codificam para um códon de parada (*nonsense*); deleções; inserções; mutações *indel*, quando deleções e inserções ocorrem concomitantemente; e as que ocorrem no *splicing* (DANG; MURRELL, 2008; LIN et al., 2012).

O diagnóstico das EB's é feito com base nos achados clínicos e laboratoriais do paciente. Na clínica é avaliado o histórico familiar e se há consanguinidade entre os pais. No laboratório, o diagnóstico vem por meio da técnica de microscopia eletrônica (ME), método padrão-ouro, que consiste na análise histológica de um fragmento do tecido cutâneo. O tratamento envolve o cuidado com as feridas e bolhas do paciente com o uso de curativos estéreis para evitar possíveis infecções. É feito o suporte nutricional e uso de antibióticos tópicos ou sistêmicos quando ocorrem contaminações. Evitar o surgimento de bolhas é a finalidade principal do tratamento, pois se virarem lesões crônicas, podem desenvolver para tumores malignos, uma das principais causas de morte em pacientes com EBD (BOEIRA, 2012).

O estudo biomolecular das Epidermólises Bolhosas, no Brasil, ainda é insuficiente sendo necessário recorrer a estudos internacionais em outras línguas. Um trabalho mais completo se faz necessário nesses parâmetros, pois, além de crescer o número de pesquisas nacionais neste campo, o estudo genético específico aliado à biologia molecular é de grande auxílio no desenvolvimento de terapias gênicas. Segundo Cutlar, Greiser e Wang (2014), a substituição de um gene defeituoso por uma cópia totalmente funcional é o princípio básico da terapia gênica. O paciente passa a produzir a proteína – que antes era sintetizada de maneira defeituosa - da forma correta, diminuindo os sintomas da doença e melhorando sua qualidade de vida consideravelmente.

O objetivo deste trabalho foi associar os principais tipos de mutações com a estrutura molecular da proteína COL7A1 relacionado aos fenótipos da Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD).

2. Metodologia

Para atingir o objetivo proposto foi realizado um estudo experimental em três etapas que consistiram na revisão bibliográfica de artigos científicos a respeito da Epidermólise Bolhosa Distrófica, processamento das informações obtidas por programas de bioinformática e elaboração dos resultados.

Para a revisão bibliográfica, artigos e teses científicas foram pesquisados nas bases de dados EBSCOhost, Scielo, Medline, PubMed, Elsevier e Bireme, utilizando as palavras-chave “epidermólise bolhosa distrófica”, “COL7A1”, “mutations and COL7A1”, “dystrophic epidermolysis bullosa” e “mutations and dystrophic epidermolysis bullosa”, e o período da busca foi definido entre os anos 2002 e 2016, não se excluindo trabalhos anteriores com importância para melhor fundamentar o tema. Também foram definidos como critérios, trabalhos escritos nos idiomas português e inglês.

2.1. Bioinformática

A bioinformática se refere ao emprego de ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas, abrangendo também as aplicações relacionadas à saúde humana como o planejamento de novos fármacos (VERLI, 2014).

A bioinformática foi a parte principal do trabalho, pois com ela foram realizadas análises sequenciais e estruturais por meio dos programas *The Sequence Manipulation Suite* (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>), *PDB - Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), *Swiss Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) e *Phyre 2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). Toda a análise do gene COL7A1 foi feita por meio do banco de dados NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Primeiramente, realizou-se a pesquisa da sequência de DNA do gene COL7A1 no banco de dados NCBI e, em seguida, analisou-se a região codante (CDS) (ID 1294) que se refere à sequência protéica do colágeno tipo VII. Para consegui-la, buscou-se no NCBI pelo transcrito do gene COL7A1 (mRNA) e, ao escolher a opção “Homo sapiens collagen type VII alpha 1 (COL7A1), mRNA”, logo a baixo das referências científicas, a CDS aparece como


opção para clique. Após clicar, a região codante é realçada para visualização. Com essa região, iniciaram-se as tentativas de modelagem da cadeia proteica do colágeno tipo VII nos programas *Swiss Model* e *Phyre 2* sem êxito, pois ela não se encontrava nos bancos de dados. Dessa forma, optou-se por se fazer uma nova busca na qual foram determinadas as regiões que correspondiam às mutações que seriam estudadas para serem modeladas como uma única estrutura artificial, mas os programas de modelamento não encontraram dados, ou seja, não foi possível modelar as sequências.



Para se chegar à sequência final utilizada neste trabalho, o segmento proteico do colágeno tipo VII foi inserido outra vez no programa *Swiss Model* para uma nova tentativa. A partir das cadeias semelhantes que foram sugeridas, selecionou-se uma variante que está de acordo com as estruturas que são descritas nos artigos científicos pesquisados que embasam este trabalho. Em seguida, o segmento foi moldado no *Swiss Model* e sua estrutura proporcionou a simulação de cadeias proteicas em condições patológicas, ou seja, com os tipos de mutações que correspondem aos fenótipos da Epidermólise Bolhosa Distrófica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Epidermólise Bolhosa Distrófica e o gene *COL7A1*

Tabela 1: Características clínicas dos subtipos da EBD.

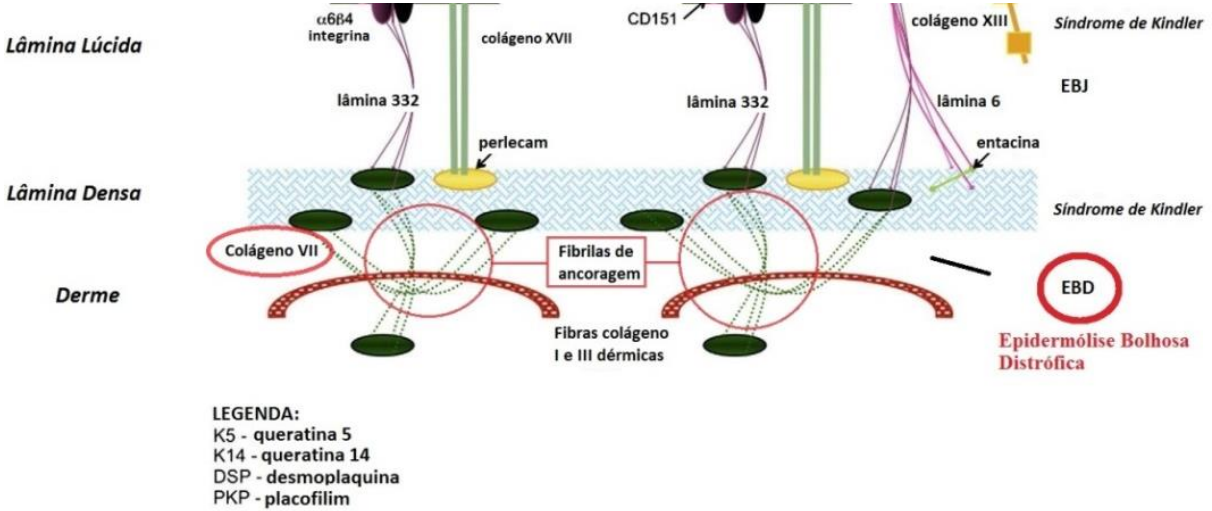
SUBTIPOS	ASPECTOS CLÍNICOS	
<p>Epidermólise Bolhosa Distrófica Dominante <i>Cockayne-Touraine</i> (EBDD-CT)</p>	<p>Formação de bolhas nas extremidades do corpo e cavidade oral (mucosas e dentes). Distrofia ou ausência de unhas.</p>	
<p>Epidermólise Bolhosa Distrófica Dominante <i>Pasini</i> (EBDD-Pa)</p>	<p>Formação de bolhas mais extensas, nas extremidades do corpo, tórax e cavidade oral (mucosas e dentes). Distrofia ou ausência de unhas.</p>	

<p>Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva não <i>Hallopeau-Siemens</i> (EBDR-nHS)</p>	<p>Formação de bolhas nas extremidades do corpo, perda das unhas. Mais grave que as formas dominantes. Pouco envolvimento das mucosas.</p>	 <p>Fonte: GÜRTLER; DINIZ; FILHO (2005).</p>
<p>Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva <i>Hallopeau-Siemens</i> (EBDR-HS)</p>	<p>Subtipo mais grave. Bolhas com distribuição generalizada pelo corpo; pseudosindactalia; perdas de unhas e dentes; mucosas internas comprometidas;</p>	

Fonte: Adaptado de BOEIRA (2012).

A Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD) é uma condição hereditária dividida em subtipos caracterizados pela distribuição de bolhas ao longo da pele e nas mucosas do paciente (BARROS; RASKIN; PEREIRA-FERRARI, 2004; BOEIRA, 2012). A Tabela 1 mostra os quatro subtipos da EBD e suas características clínicas.

Figura 1: Ultraestrutura da zona de membrana basal e proteínas envolvidas na EB.

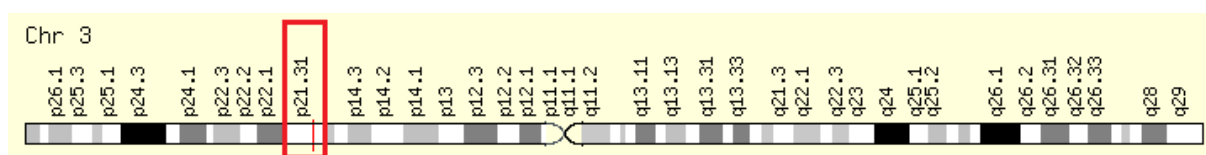


Fonte: Adaptado de BOEIRA (2012).

Os defeitos que provocam os fenótipos da EBD encontram-se na proteína colágeno tipo VII que forma as fibrilas de ancoragem presentes entre a lâmina densa e a sublâmina densa na junção dermo-epidérmica, local onde as bolhas são formadas, como mostra a Figura 1 (DANG; MURRELL, 2008).

Os quatro subtipos principais descritos de EBD decorrem de mutações em um mesmo gene, o *COL7A1*, que codifica o colágeno tipo VII e está presente no cromossomo 3 na posição p21.31 (Figura 2) (WEINEL, 2008). Cada subtipo varia de acordo com o tipo da mutação e sua localização, desde o fenótipo mais severo, a forma recessiva *Hallopeau-Siemens*, até os mais brandos, as formas dominantes *Cockayne-Touraine* e *Pasini* (BOEIRA, 2012).

Figura 2: Mapeamento físico do gene *COL7A1* (GenBank ID 1294) no locus 3p21.31.

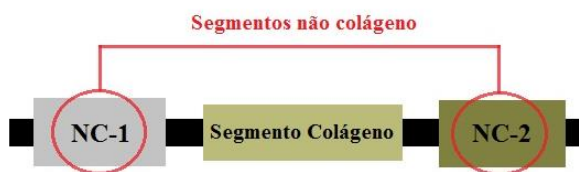


Fonte: Adaptado de GENECARDS (2016).

3.2. Colágeno tipo VII

O colágeno tipo VII é produzido por queratinócitos epidérmicos e fibroblastos dérmicos. Durante o processamento intracelular, o transcrito mRNA é traduzido em uma cadeia polipeptídica pro α 1 (VII), que se une com mais duas cadeias pro α 1, gerando uma estrutura de 2944 aminoácidos constituída por um domínio central triplo-helicoidal de colágeno precedido e seguido por dois domínios não colagênicos, o NC-1 (não colagênico-1), ampla cadeia amino-terminal, e a porção de menor tamanho NC-2 (não colagênico-2), carboxi-terminal, como pode ser visto na representação simplificada da Figura 3 (DANG; MURRELL, 2008).

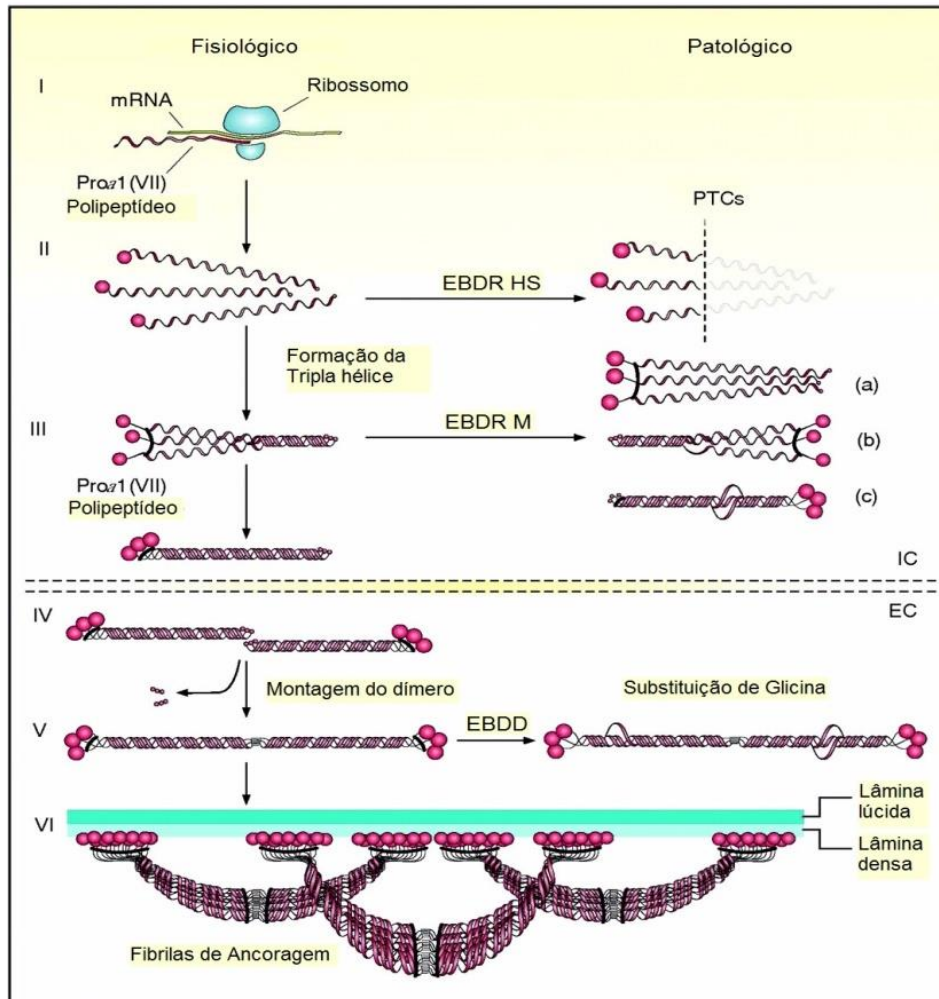
Figura 3: Representação esquemática da molécula de colágeno tipo VII.



Fonte: Adaptado de ALMEIDA JR (2012).

O centro de sua estrutura também possui um pequeno segmento não colagênico, o que garante flexibilidade à proteína. A fusão de duas moléculas triplo helicoidal ocorre em nível extracelular, pela perda do segmento NC-2 resultando, assim, em dímeros antiparalelos cuja união destes, por sua vez, formará as fibrilas de ancoragem (Figura 4) (ALMEIDA JR, 2002; VARKI et al., 2006).

Figura 4: Formação do colágeno tipo VII sob condições fisiológicas (lado esquerdo) e condições patológicas (lado direito), evidenciando os subtipos da EBD.



Fonte: Adaptado de VARKI et al. (2006).

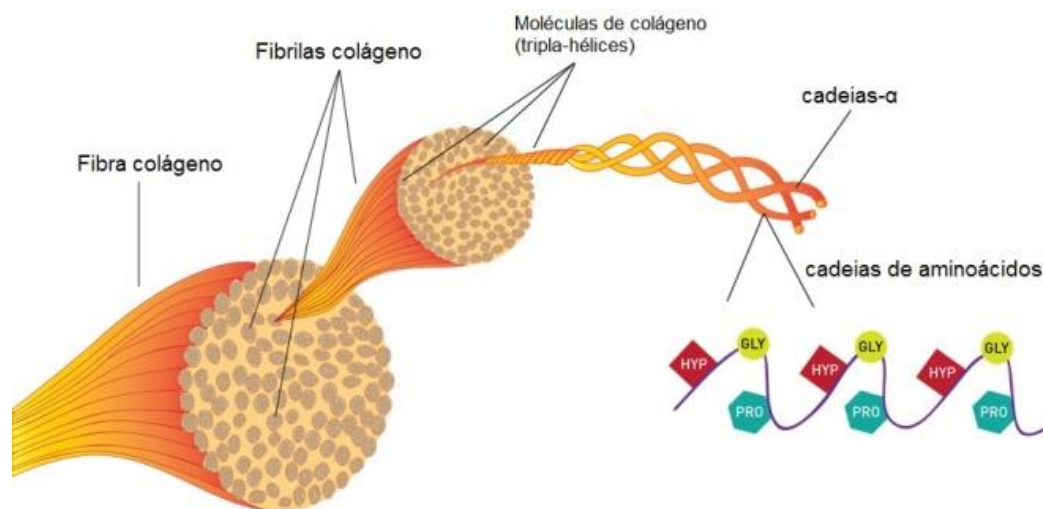
É uma proteína de extrema importância na junção dermo-epidérmica, pois é ela que constitui firmeza e flexibilidade às fibrilas de ancoragem mantendo assim, a zona de membrana basal (ZMB) e a derme unidas e firmes. Com o colágeno produzido de forma defeituosa, a manutenção desta junção fica prejudicada. O resultado é que a cada atrito que a pele sofra, por menor que seja, há formação de bolhas.

Como dito anteriormente, já foram descritas mais de 730 mutações para a EBD que resultam em um colágeno defeituoso. As consequências variam de acordo com o tipo de

mutação ocorrida, como a PTC (*Premature Termination Codon*), notado na Figura 4, a qual geralmente está associada a mutações do tipo *nonsense* (codificam para um aminoácido de parada) e deleções, frequentes no fenótipo EBDR-HS, quando presente nos dois alelos. Mutações que codificam para um aminoácido diferente (*missense*), referido principalmente como substituições do aminoácido glicina (Gly) na Epidermólise Bolhosa Distrófica, e inserções estão comumente associadas com fenótipo EBDR-nHS e, também, com os subtipos dominantes (EBDD-CT e EBDD-Pa), que são formas mais brandas. Essas mutações podem ocasionar interferência na associação das cadeias de colágeno e na formação da tripla hélice causando assim desestabilização desta molécula. As substituições do aminoácido Gly (Glicina), também na tripla hélice do colágeno, geram interferência na formação dos dímeros que constituem as fibrilas de ancoragem, comuns nos fenótipos da EBDD (ALMEIDA JR, 2002; VARKI et al., 2006; DANG; MURRELL, 2008).

A disposição da tripla-hélice do colágeno tipo VII, região de estudo deste trabalho, é composta por sessões repetidas do motivo Gly-X-Y, sendo que X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, mas geralmente, suas posições são ocupadas por Prolina (PRO) e Hidroxiprolina (HYP) (Figura 5) (MANKA et al., 2012).

Figura 5: Constituição da molécula de colágeno.

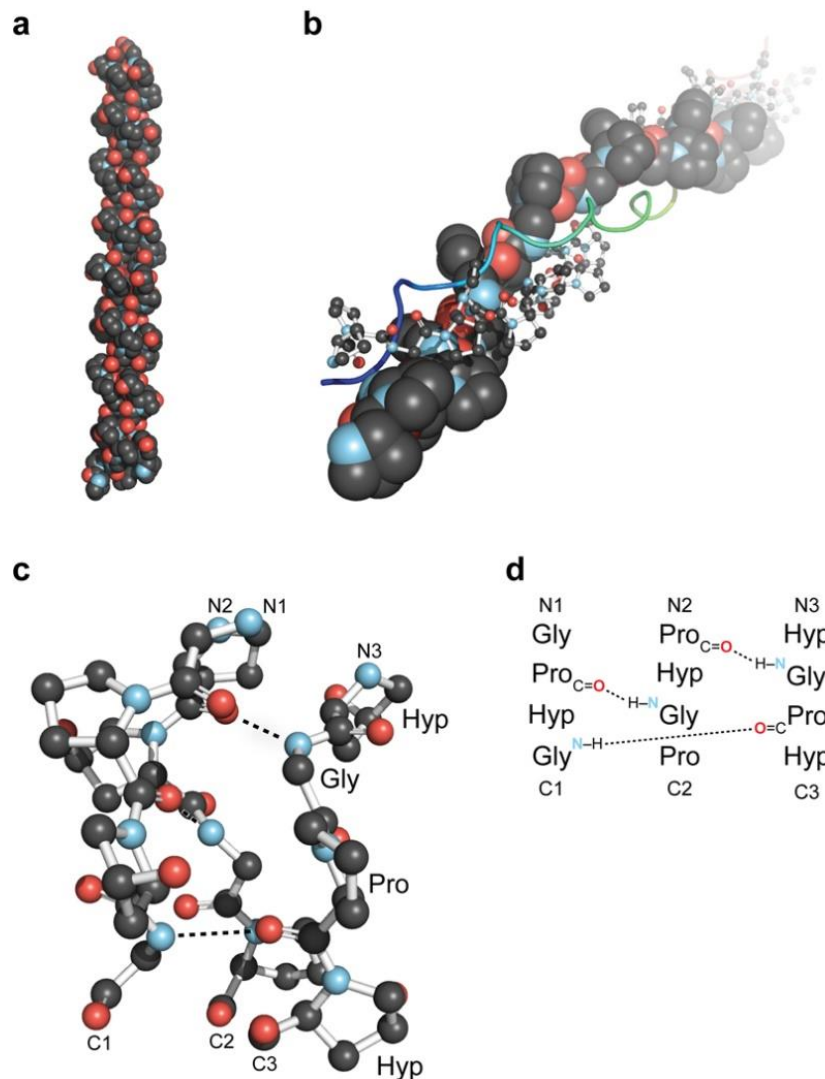


Fonte: PROTO-COL UK (2014).

A estrutura em hélice das cadeias- α (pro α 1) do colágeno garante à proteína a rigidez necessária para manter derme e epiderme unidas. Isso acontece porque cada aminoácido dessa repetição tem uma função precisa: a cadeia lateral da glicina que corresponde a um átomo de hidrogênio é a única porção que pode se encaixar no centro apertado da estrutura em tripla hélice. As pontes de hidrogênio são favorecidas pelos grupos químicos presentes na ligação

peptídica entre a porção NH de um resíduo de glicina com um grupo carbonilo (C=O) segurando, assim, as três cadeias em conjunto. O ângulo fixo de C-N peptídeo-prolina ou peptídeo-hidroxiprolina permite que a cadeia polipeptídica, ao dobrar-se em uma hélice, constitua uma geometria na qual as cadeias polipeptídicas podem se torcer em conjunto para formar uma cadeia triplo-helicoidal, como mostra a Figura 6. Curiosamente, apesar das ligações rígidas peptídeo-prolina perturbarem a estrutura de aminoácidos em uma cadeia α -hélice, elas estabilizam a estrutura final em tripla-hélice (LI; BRODSKY; BAUM, 2007; SHOULDERS; RINES, 2009).

Figura 6: Visão geral da estrutura molecular da tripla-hélice do colágeno. Em (a), a estrutura cristalina de alta resolução da tripla-hélice. Em (b), a tripla-hélice em três representações: átomos inchados (*space-filling*), *ball-and-stick* (bola-e-vara) e em fita. Em (c), um segmento *ball-and-stick* da tripla-hélice com destaque para as ligações de hidrogênio intercadeias. E em (d), ligações polipeptídicas entre as cadeias- α .



Fonte: SHOULDERS; RAINES (2009).

3.3. Fase experimental: modelamento das cadeias proteicas

A literatura não descreve mutações que ocorram de forma frequente na EBD. Logo, não existe uma mutação principal a ser estudada. Em razão disso, preferiu-se estudar os tipos de mutações que levam aos diferentes níveis fenotípicos da Epidermólise Bolhosa Distrófica.

Sabe-se que as cadeias proteicas de colágeno mudam de acordo com a mutação que ocorre na sequência de aminoácidos e sua localização. Essas diferentes estruturas foram representadas e analisadas neste trabalho, comparando-as a uma cadeia normal, ou seja, sem alterações ou mutações.

O programa de modelagem de proteínas, *Swiss Model*, sugeriu a variante proteica de ID 4AUO.2.B: um polipeptídeo de 38 aminoácidos com o motivo Gly-X-Y que aparece repetidamente na estrutura (GPPGPPGPPGPQGLAGQRGIVGLPGQRGERGPPGPPGP) o qual corresponde à cadeia B da tripla-hélice da proteína colágena intersticial presente nos colágenos tipo I, II e III. Sua constituição assemelha-se bastante com a do colágeno tipo VII e, por isso, foi utilizada para demonstração das mutações relacionadas aos fenótipos de EBD (Figura 7) (BISIANI et al., 2014).

Figura 7: Representação da cadeia B normal da proteína colágeno intersticial.



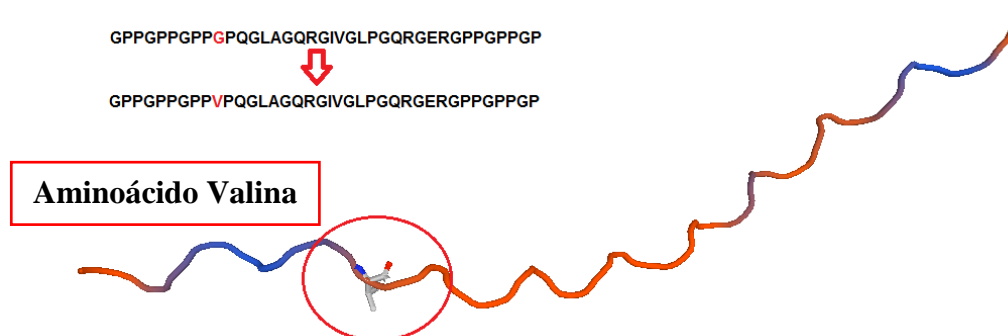
Fonte: BIASINI et al. (2014).

Os tipos de mutações mais comuns registrados na literatura que levam à EBD são *missense*, *nonsense*, deleções, inserções e mutações *indel*. Todos esses tipos terão suas estruturas representadas nas figuras seguintes, com exceção do tipo de mutação *nonsense*, que gera uma cadeia de aminoácidos insuficiente para ser modelada pelo *Swiss Model*. Essas mutações provocam uma terminação prematura do códon (PTC) resultando em uma proteína truncada não funcional e que, na maioria das vezes, relaciona-se com os fenótipos recessivos

da EBD, sobretudo a forma mais severa: *Hallopeau-Siemens*. Esta pode ocorrer em heterozigose, PTC combinada com outro tipo de mutação como, por exemplo, PTC e uma substituição de glicina, e em homozigose, quando PTC ocorre em ambos os alelos (DANG; MURRELL, 2008).

Mutações *missense* codificam para um aminoácido diferente. Na EBD, geralmente estão associadas a substituições de glicina resultando, na maioria das vezes, nos fenótipos dominantes (EBDD-CT e EBDD-Pa), que se caracterizam por serem mais brandos clinicamente. Isso acontece porque essas substituições causam apenas uma pequena torção irregular no local da mutação na sequência de aminoácidos da proteína, desestabilizando sua estrutura e comprometendo-a, causando interferência na formação dos dímeros que constituem as fibrilas de ancoragem (DANG; MURRELL, 2008; DENG et al., 2008; VARKI et al., 2006). A Figura 8 evidencia essa torção anormal.

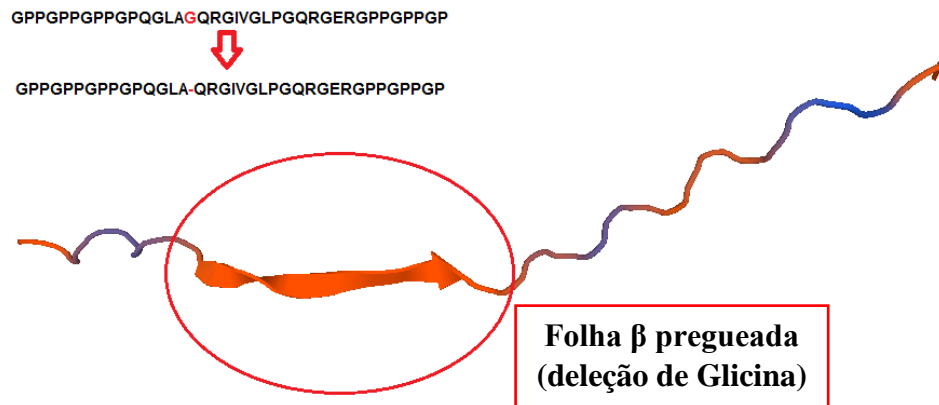
Figura 8: Representação de mutação do tipo *missense* circulada em vermelho: substituição de Glicina por Valina na posição 10.



Fonte: Adaptado de BIASINI et al. (2014).

Mutações que provocam deleção estão relacionadas com os fenótipos recessivos da EBD e, na maioria das vezes, com os casos mais graves: os de EBD recessiva *Hallopeau-Siemens*. Deleções causam alterações muito problemáticas na proteína colágena, comprometendo sua funcionalidade quase por completo. A Figura 9 representa uma deleção do aminoácido glicina que gerou um motivo com estrutura em folha β pregueada (representada pelo formato em seta) entre a hélice da cadeia. Sabe-se que o colágeno tem como característica física sua rigidez, que é proporcionada pela estrutura em hélice de sua cadeia proteica (DANG; MURRELL, 2008; VARKI et al., 2006). A folha β pregueada compromete essa rigidez deixando o colágeno muito maleável, fazendo com que ele perca sua real função de aderência e firmeza para a pele, deixando-a literalmente frouxa.

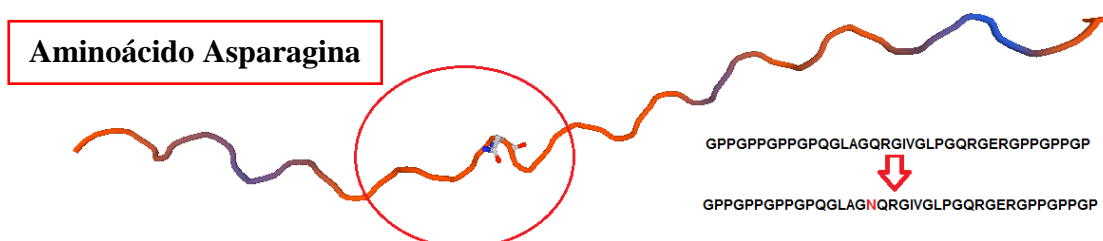
Figura 9: Representação de mutação do tipo deleção circulado em vermelho: deleção de Glicina na posição 16.



Fonte: Adaptado de BIASINI et al. (2014).

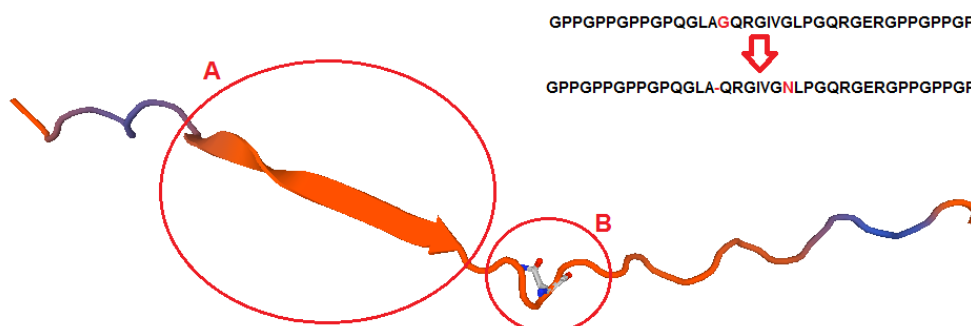
Mutações de inserção e mutações do tipo *indel* estão relacionadas, assim como, as deleções, na maior parte das vezes, com os fenótipos recessivos, principalmente a EBDR-HP. A inserção de outro aminoácido na cadeia proteica gera interferência entre as repetições do motivo Gly-X-Y, mudando a conformação da proteína levando a uma torção muito alterada que desestabiliza toda sua estrutura. Essa anormalidade pode ser vista na Figura 10 e na Figura 11 (B). A literatura descreve que inserções e mutações *indel* acarretam como consequência PTC na cadeia polipeptídica, interferindo em toda a funcionalidade do colágeno resultando, assim, nos fenótipos recessivos de EBD. Como dito anteriormente, a estrutura de folha β pregueada na cadeia colagênica, vista na Figura 11 (A) provoca mudanças significativas na funcionalidade da proteína, uma vez que sua rigidez fica extremamente comprometida. Por esse motivo, mutações *indel* em ambos os alelos, quase sempre, irão se relacionar com o fenótipo mais severo EBDR-HS (DANG; MURRELL, 2008).

Figura 10: Representação de mutação do tipo inserção circulado em vermelho: inserção de Asparagina na posição 17.



Fonte: Adaptado de BIASINI et al. (2014).

Figura 11: Representação de mutação do tipo *indel*: em **A**, deleção de Glicina na posição 16 e em **B**, inserção de Asparagina na posição 23.



Fonte: Adaptado de BIASINI et al. (2014).

A experimentação mostrou que as mutações do tipo *missense* geralmente relacionam-se com os perfis fenotípicos autossômicos dominantes: EBDD-CT e EBDD-Pa. Na maioria dos casos, tratam-se de substituições do aminoácido glicina e não trazem perda funcional completa à molécula de colágeno tipo VII, ocasionando fenótipos de EBD clinicamente mais brandos. Já os outros tipos (*nonsense*, deleções inserções e *indel*) estão mais associados aos fenótipos autossômicos recessivos: EBDR-nHP e EBDR-HP. Mutações que provocam estes quadros clínicos mais severos resultam em uma proteína truncada não funcional, principalmente quando ocorrem mutações *nonsense*, pois provocam uma terminação prematura do códon (PTC). Podem também trazer outras conformações à proteína, como a folha β pregueada e torções anormais, cujas estruturas causam desestabilização do domínio proteico prejudicando quase toda a funcionalidade do colágeno no tecido.

O estudo molecular relacionado à Epidermólise Bolhosa Distrófica se faz necessário, sobretudo, para trazer novas perspectivas de tratamento, novos medicamentos e diagnósticos mais rápidos e avançados para os portadores desta doença. Um bom exemplo são as terapias gênicas que envolvem o uso de DNA's recombinantes e que, atualmente, estão sendo vastamente estudadas e experimentadas, com o propósito de melhorar consideravelmente a qualidade de vida de pacientes diagnosticados com EBD (CUTLAR; GREISER; WANG, 2014). Para isso, é necessário o conhecimento prévio dos aspectos moleculares do fenótipo que o indivíduo apresenta, como o tipo de mutação e o nível de funcionalidade do colágeno tipo VII no tecido, bem como, mostram os estudos apresentados neste trabalho. Além dessas terapias, é indispensável conhecer os aspectos funcionais do colágeno tipo VII. Um estudo recente realizado na Universidade de Oxford mostrou que este tipo de colágeno está associado

ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (CCE), pois ele suprime a sinalização do TNF β e a angiogênese inibindo o crescimento tumoral. O colágeno tipo VII, nestes casos, está sendo estudado como terapia para CCE (MARTINS et al., 2016). Por esses motivos, os estudos moleculares se mostram tão importantes, pois auxiliam pesquisadores na busca de novas estratégias para melhorar a qualidade de vida de pacientes não só com EBD, mas outras enfermidades genéticas sem cura.

4. Conclusão

De acordo com os estudos realizados, os fenótipos da Epidermólise Bolhosa Distrófica se diferenciam de acordo com o tipo de mutação que ocorre na sequência gênica e, também, sua localização. Cada um destes tipos resulta em uma cadeia proteica com características desfavoráveis à funcionalidade do colágeno tipo VII levando a um perfil fenotípico diferente, variando clinicamente, do brando ao mais severo. Os tipos de mutações que mais ocorrem são *missense*, *nonsense*, mutações *indel*, deleções e inserções.

Conclui-se que o a mutação que traria menor acometimento clínico seriam as do tipo *missense* e que a Epidermólise Bolhosa Distrófica pode apresentar vários níveis clinicamente dependendo da mutação que ocorre no gene *COL7A1* e o colágeno tipo VII pode ficar parcialmente ou completamente não funcional.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha mãe e irmãos, que me apoiaram em toda a jornada acadêmica com muitas palavras de motivação. Minha mãe, Tânia, sempre muito paciente, me ajudou em todos os momentos. Muito obrigada por tudo e por ser essa linda mulher. Família é tudo e sempre será.

Ao meu orientador, professor e amigo, Paulo Roberto, por todo o auxílio, não só neste projeto, mas também em toda a graduação. Suas palavras são preciosas e tudo que aprendi com o senhor levarei em minha vida. Um simples obrigada não é o bastante tamanho o sentimento de gratidão que tenho por tudo que o senhor me ensinou e espero poder, de coração, continuar aprendendo com suas palavras.

Ao meu colega e amigo, Mateus Costa, que me indicou o tema deste trabalho e ajudou a solucionar os vários problemas. Obrigada pela sua paciência, parceria e dedicação. Sua ajuda foi importante para concluir este projeto e serei sempre grata por isso.

Por fim, aos meus amigos queridos, sem vocês essa graduação não seria tão gratificante. Obrigada por me acompanharem, por fazerem parte da minha vida, por me ajudarem não só com este trabalho, mas com todos do curso, por me aguentarem nos momentos de chateação, por serem essas pessoas maravilhosas. Vocês são mais que amigos pra mim! E ao meu namorado, Marcelo Carvalho, meu melhor amigo. Você sempre me entende quando preciso estudar, principalmente durante este trabalho, e me falou muitas palavras de motivação para terminá-lo. Eu sempre serei grata por você ser essa pessoa tão paciente e cuidadosa. Você é muito especial pra mim!

A todos vocês dedico este trabalho.

5. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA JR, H. L. Molecular Genetics os Epidermolysis Bullosa. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 519-532, set./out. 2002.
- BARROS, I. R.; RASKIN, S.; PEREIRA-FERRARI, L. Epidermólise Bolhosa Distrófica: Relato de um caso brasileiro. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 26, n. 57, p. 25-30, out/dez. 2004.
- BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, London, v.42, p. W252-W258, jul. 2014.
- BOEIRA, V. L. S. Y. **Epidermólise Bolhosa Hereditária: Uma revisão literária**. 2012. 42 f. Tese (Monografia) - Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- CUTLAR, L.; GREISER, U.; WANG, W. Gene therapy: pursuing restoration of dermal adhesion in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Experimental Dermatology**, Sydney, v. 23, n. 1, p. 1-6, jan. 2014.
- DANG, N.; MURRELL, D. F. Mutation analysis and characterization of *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. **Experimental Dermatology**, Sydney, v. 17, n. 7, p. 553-568, jul. 2008.
- DENG, W.; CHEN, S.; LU, C.; ZHOU, X.; CHEN, M.; LAI, W.; WANG, Y. A novel p.Gly1700Asp mutation in *COL7A1* responsible for dominant dystrophic epidermolysis bullosa: More severe phenotype in female members of a Chinese Family. **Journal of Dermatological Science**, Singapore, v.49, n. 2, p. 166-169, fev. 2008.
- GENECARDS. ***COL7A1* Gene (Protein Coding)**. Rehovot, 2016. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL7A1>>. Acesso em: 22 jun 2016.
- GÜRTLER, T. G. R.; DINIZ, L. M.; FILHO, J. B. S. Epidermólise bolhosa distrófica recessiva mitis - Relato de caso clínico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 503-508, set/out. 2005.
- LI, Y.; BRODSKY, B.; BAUM, J.; NMR Shows Hydrophobic Interactions Replace Glycine Packing in the Triple Helix at a Natural Break in the (GLY-X-Y) Repeat. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 282, n. 31, p. 22699-22706, ago. 2007.
- LIN, Y.; CHEN, X. J.; LIU, W.; GONG, B.; XIE, J.; XIONG, J. H.; CHENG, J.; DUAN, X. L.; LIN, Z. C.; HUANG, L. L.; WAN, H. Y.; LIU, X. Q.; SONG, L. H.; YANG, Z. L. Two Novel Mutations on Exon 8 and Intron 65 of *COL7A1* Gene in Two Chinese Brothers Result in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. **Journal Plos One**, Columbus, v. 7, n. 11, p. e50579, nov. 2012.
- MANKA, S. W.; CARAFOLI, F.; VISSE, R.; BIHAN, D.; RAYNAL, N.; FARNDAL, R. W.; MURPHY, G.; ENGHILD, J. J.; HOHENESTER, E.; NAGASE, H. Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1. **PNAS Early Edition**. Washington.DC, v. 109, n. 31, p. 12461-12466, jul. 2012.
- MARTINS, V. L.; CALEY, M. P.; MOORE, K.; SZENTPETERY, Z.; MARSH, S. T.; MURREL, D. F.; KIM, M. H.; AVARI, M.; MCGRATH, J. A.; CERIO, R.; KIVISAARI, A.; KÄHÄRI, V. M.; HODIVALA-DILKE, K.; BRENNAN, C. H.; CHEN, M.; MARSHAL, J.

F.; O'TOOLE, E. A. Suppression of TGF β and Angiogenesis by Type VII Collagen in Cutaneous SCC. **Journal of the National Cancer Institute**, London, v. 108, n. 1, p. 1-11, jan. 2016.

MEDICINAPERTUTTI. **Membrana basale**. Borgorose, 2015. Disponível em: <<http://medicinapertutti.altervista.org/argomento/membrana-basale/>>. Acesso em: 19 mai 2016.

OLIVEIRA, Z. N. P.; PÉRIGO, A. M.; FUKUMORI, Lígia M. I.; AOKI, V. Imunomapeamento nas epidermólises bolhosas hereditárias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 856-861, nov/dez. 2010.

PROTO-COL UK. **What is collagen?**. Londres, 2014. Disponível em: <<http://www.protocol.com/blog/2014/07/collagen/>>. Acesso em: 19 jun 2016.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T.; Collagen structure and stability. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, n. 1, p. 929-958, mar. 2009.

VARKI, R.; SADOWSKI, S.; UITTO, J.; PFENDNER, E. Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype–genotype correlations in the dystrophic subtypes. **Journal of Medical Genetics**, Londres, vol. 44, n. 3, p. 181-192, mar/abr. 2006.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: SBBq, 2014.