



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE - FACES
CURSO DE BIOMEDICINA

MATEUS COSTA DE SANTANA

ASSOCIAÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS GENES *KRT5* E *KRT14* NA EPIDERMÓLISE
BOLHOSA SIMPLES

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

Orientador (a): Professor Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA

2016

Resumo

Introdução: A Epidermólise Bolhosa (EB) faz parte de um grupo de doenças genéticas dermatológicas caracterizadas pela formação de bolhas na pele, devido aos defeitos presentes nas proteínas estruturais, que são importantes na adesão das camadas epidérmica e dermo-epidérmica. **Objetivo:** Foi relacionar os fenótipos da EB Simples da região basal a partir das mutações encontradas em locais dos genes que modificam a função das proteínas queratina-5 e -14. **Metodologia:** Foi feito um estudo experimental utilizando programas da bioinformática para elucidar as estruturas proteicas anormais, das queratina-5 e queratina-14 que representam os principais subtipos da EB Simples. **Considerações finais:** Após observar as alterações nas estruturas tridimensionais das K5 e K14 pelo SWISS-MODEL, foi possível demonstrar mutações que ocorrem em locais específicos dos genes, responsáveis por um subtipo da EBS, e que as interações intermoleculares e intramoleculares, são importantes para manter a estrutura tridimensional e conservar a função normal das proteínas.

Palavras-chave: Epidermólise Bolhosa Simples, Bioinformática, *KRT5*, *KRT14*.

Association of mutations in *KRT5* and *KRT14* genes in Epidermolysis Bullosa Simple

Abstract

Introduction: Epidermolysis Bullosa (EB) is part of a group of genetic skin disease characterized by blistering of the skin due to defects present in the structural proteins that are important in the adhesion of epidermal layer and dermal-epidermal junction. **Objective:** list the phenotypes of EB Simple basal region from the mutations found in locations of genes that modify the function of proteins keratin-5 and -14. **Methodology:** A study was done experiments using bioinformatics programs to elucidate abnormal protein structures, the keratin-5 and keratin-14 representing the major subtypes of EB Simple. **Final Thoughts:** After observing the changes in the three-dimensional structures of K5 and K14 by SWISS-MODEL, was demonstrated mutations that occur in specific locations of the genes responsible for a subtype of EBS, and the intermolecular interactions and intramolecular are important to keep the tridimensional structure and maintain normal function of the protein.

Keywords: Epidermolysis Bullosa Simplex, Bioinformatics, *KRT5*, *KRT14*.

*Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

mateus_rpg40@yahoo.com.br

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

1. Introdução

A Epidermólise Bolhosa (EB) faz parte de um grupo de doenças genéticas dermatológicas caracterizadas pela formação de bolhas na pele, devido aos defeitos presentes nas proteínas estruturais, que são importantes na adesão das camadas epidérmica e dermo-epidérmica. Este defeito favorece o aparecimento de bolhas, quando o tecido sofre agressões externas e, até mesmo, por variações altas de temperatura (ALMEIDA JR, 2002).

A Epidermólise Bolhosa é uma doença rara que afeta indivíduos de etnias diferentes e, não há distinção entre os gêneros masculino e feminino. Foram feitos vários estudos em diversas populações e foi demonstrado que os Estados Unidos têm um registro mais rigoroso entre os demais. Dados coletados nos anos de 1986 até 2002 permitiu correlacionar o índice da prevalência de 8: 1.000.000 de pessoas em 1990, sendo que foram descobertos cerca de 3.300 casos de EB, a incidência ficou em 1: 1.000.000 dos nascidos vivos entre os anos de 1986 e 1990. Foi demonstrado que o grupo da EB Simples possui o maior número de casos e o subtipo EB-Localizada com maior índice. A maior prevalência dos casos da EB Juncional foi a forma mais branda Não-Herlitz. Na distrófica recessiva, a mais comum foi Não-Hallopeau Siemens. A prevalência e incidência devem possuir uma semelhança entre as demais populações devido a uma pequena diferença nos valores comparados ao registro dos Estados Unidos e, assim, demonstram que não tem distinção entre as localidades geográficas e etnias (BOEIRA, 2012).

A patologia foi classificada em quatro tipos principais depois da reunião do consenso internacional da Epidermólise Bolhosa no ano de 2008 e, a divisão ficou em: EB Simples (EBS); EB Juncional (EBJ); EB Distrófica (EBD); e Síndrome de Kindler. Esta divisão deve-se a quantidade de genes e fenótipos clínicos diferentes da Epidermólise Bolhosa. A EBS divide-se em dois tipos principais: A supra basal ocorre em camadas acima dos queratinócitos basais da epiderme e, a basal que afeta os queratinócitos basais. Os genes mais estudados da EBS são o *KRT5* e a *KRT14* responsáveis por sintetizar as queratinas-5 e -14 dos filamentos intermediários e são de herança autossômica dominante (FINE et al., 2014). Em alguns estudos foram relatados casos da EBS que apresentaram herança autossômica recessiva, mas principal no gene *KRT14* e, representam apenas 5% de todas as mutações da EBS sendo que o fator principal relacionado é a consanguinidade (GARCÍA et al., 2011).

Os tipos EBJ e EBD não demonstram problemas nas adesões dermo-epidérmica na zona da membrana basal, mas, ocorrem na lâmina lucida e lâmina densa, respectivamente (ALMEIDA JR, 2002). Os genes da EBJ são: *LAMA3*; *LAMB3*; *LAMC2*; *COL17A1*; *ITGA6*;

ITGA3; e *ITGB4*. Na EBD só foi relatado o gene *COL7A1* e, nestas formas são encontrados tanto padrões de herança autossômico dominante e recessivo entre os subtipos (FINE et al., 2014; GHR, 2015a; GHR, 2015b).

A Síndrome de Kindler é uma dermatose padrão de herança autossômica recessiva e a formação das bolhas pode ocorrer em múltiplos níveis na membrana basal intralâmina lucida e sublâmina densa e apresenta uma particularidade de fotosensibilidade. O gene associado com esta síndrome é o *FERMT1 (KIND1)* (FINE, 2010).

Os genes *KRT5* e *KRT14* juntos sintetizam as proteínas do citoesqueleto denominadas de filamentos intermediários de queratina. As proteínas do citoesqueleto são importantes para contração muscular, movimento celular, transporte de componentes intracelulares, assim como na determinação morfológica das células. O filamento intermediário está presente em todas as células, fornecendo força e resistência aos tecidos contra danos externos. A sua estrutura pode ser feita de queratina, vimentina ou desmina. Entretanto, elas estão presentes em tecidos diferentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ALMEIDA JR, 2004).

O corpo humano é protegido pelas barreiras epiteliais que são componentes importantes da imunidade inata, entre elas tem-se a pele, e os revestimentos epiteliais internos do trato gastrointestinal e respiratório. Por estarem em contato direto com o meio externo, as barreiras físicas impedem a invasão de patógenos, protegem o epitélio contra agressões externas, previnem a desidratação, realiza a produção de peptídeos que agem como antibióticos e linfócitos epiteliais que ajudam a combater microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2009). Atualmente, não se possui muitas informações detalhadas a respeito das mudanças estruturais destas proteínas com a EB. O conhecimento das alterações anormais, ajuda no desenvolvimento de métodos e tratamentos eficazes e, assim, melhorar a qualidade de vida dos pacientes que convivem com esta doença.

O objetivo desse trabalho foi relacionar os fenótipos da EB Simples da região basal a partir das mutações encontradas nos genes que codificam as proteínas queratina-5 e -14.

2.1. Metodologia

No trabalho foi feito um estudo experimental utilizando programas da bioinformática para elucidar as estruturas protéicas anormais das queratina-5 e queratina-14 que representam os principais subtipos da Epidermólise Bolhosa Simples (EBS). Este estudo teve o auxílio de uma revisão bibliográfica a partir de periódicos científicos nacionais e internacionais relacionados com a EBS e dos genes *KRT5* e *KRT14*.

Foram feitas pesquisas em artigos científicos e teses nacionais e internacionais nas bases de dados da EBSCOhost, Scielo, PubMed, Medline, Elsevier, Bireme e Google Acadêmico no período de 2000 a 2016 e foram adicionados artigos clássicos para elucidação de alguns termos. As palavras-chave foram: “Epidermólise Bolhosa Simples”; “Filamentos Intermediários”; “Estrutura”; “KRT5”; e “KRT14” em inglês ou português separadamente e combinações das mesmas utilizando o conectivo AND.

2.2. 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).

As ferramentas utilizadas no trabalho estão presentes nos seguintes sites da internet: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); The Sequence Manipulation Suite (SMS) (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>); Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home>); e SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>).

O site da NCBI é um banco de dados de nucleotídeos, que além de disponibilizar sequências gênicas de várias espécies, disponibiliza o uso de várias ferramentas para trabalhar com essas sequências. Primeiro foi feita uma busca dos genes no banco de dados de nucleotídeos NCBI para adquirir informações das sequências nucleotídicas da *KRT5* e *KRT14*. Estas informações foram usadas para construir um modelo da proteína, mas antes da modelagem, foi usado a ferramenta GenBank Trans Extractor do SMS para conseguir as sequências peptídicas. Em seguida, essas sequências foram submetidas à análise através da ferramenta Modelling que se encontra no site do SWISS-MODEL, resultando em 3 modelos com sequência mais próximas da sequência modelo. As únicas sequências que representavam as queratina-5 e queratina-14 foram os domínios helicoidal 2B de ambas proteínas. O número de chamada das proteínas foram: 3tnu.1.A (Queratina-14) e 3tnu.1.B (Queratina-5) estão depositadas no banco de dados de proteína PDB e foram usadas para modelar as proteínas com mutações. Foi feita uma árvore filogenética do tipo circular para os genes *KRT5* e *KRT14* a partir da ferramenta BLAST presente no NCBI usando a sequência NM_000424.3 do gene *KRT5* como base, para o alinhamento entre outras sequências do gene *KRT5* (M21389.1; NM_000424.2; BC024292.1) e para a sequência base NM_000526.4 do gene *KRT14* com outras sequências da *KRT14* (BT007186.1; BC094830.1; NM_000526.3). Foram escolhidas

apenas 3 sequências gênicas, sendo que deveriam apresentaram uma identidade acima de 95%. Na construção dos gráficos foi necessário utilizar as informações do banco de dados do filamento intermediário humano (HIFD), para criar um critério de seleção de mutações a partir das substituições mais frequentes de nucleotídeos nos genes *KRT5* e *KRT14*, e o principal domínio que apresenta o maior índice de mutações nas queratinas do tipo I e tipo II.

3. Resultados e Discussão

A Epidermólise Bolhosa Simples (EBS) do tipo basal apresenta três subtipos, estas variações são o resultado de mutações que ocorrem dentro de regiões específicas dos genes *KRT5* ou *KRT14*. A formação das bolhas se dá pela ruptura das células basais presentes na camada da epiderme; são células denominadas de queratinócitos, responsáveis pela síntese de queratinas importantes para o tecido, sendo que estas proteínas serão usadas para formar os filamentos intermediários de queratina. As bolhas representam uma consequência do enfraquecimento das proteínas queratina e, pelo fato de ter uma lise dessas células, alguns autores chamam esta patologia de Epidermolítica (ALMEIDA JR, 2002).

O quadro clínico de cada um dos subtipos da EBS é classificado pela forma com que elas se manifestam. Os principais fatores para diferenciá-las são os locais em que as bolhas se formam, a intensidade e em qual momento da vida que os sinais e sintomas começam a se desenvolver. Na tabela 1 tem-se estas três principais características do quadro clínico, além de outros achados importantes como, anemia devido à perda de sangue causada pelas bolhas que acabam se rompendo e outros achados que foram observados em alguns pacientes (LIOVIC et al., 2004). Os subtipos são da EBS do tipo basal são: EBS Localizada (antigamente Weber-Cockaine); EBS Generalizada Intermediária (antigamente Köebner); e EBS Generalizada severa (antigamente Dowling-Meara). A forma Localizada apresenta bolhas restritas nas mãos e pés, tanto no dorso quanto na região palmar e solado dos pés, mas estão presentes em regiões em que ocorrem bastante atrito físico. As duas formas generalizadas podem ocorrer em qualquer lugar no corpo e manifestam-se desde o nascimento, só que a intensidade dos sinais e sintomas entre elas são diferentes. Sendo que a forma Generalizada Severa apresenta hiperqueratose nas palmas e solado dos pés, e pela presença de bolhas na mucosa de alguns pacientes (MACHADO et al., 2002; JEŘÁBKOVÁ et al., 2010). Na figura 1 pacientes com os três subtipos da EBS.

Tabela 1: Características clínicas dos subtipos da EBS.

	EBS-localizada	EBS-generalizada severa	EBS-generalizada intermediária
<i>Nomes antigos</i>	Weber-Cockayne	Dowling-Meara, Hepertiforme	Outra generalizada, Não Dowling-Meara, Koebner
<i>Padrão de herança</i>	AD	AD	AD
<i>Primeiros sintomas</i>	Primeira infância	Nascimento	Nascimento
<i>Distribuição das Bolhas (Predomínio)</i>	Mãos, Palmas, Pés e Sola.	Generalizada	Generalizada
<i>Achado na pele (frequência*)</i>			
<i>Bolhas</i>	4+	4+	4+
<i>Milia</i>	Raro	1-2+	1+
<i>Cicatrizes atróficas</i>	Raro	2+	1+
<i>Distrofia / ausência de unha</i>	Incomum	2+	1-2+
<i>Hiperqueratose</i>	Focal (em alguns da maioria)	Geralmente difusa	Focal
<i>Indução relativa de bolhas</i>	Comum	Comum	Comum
<i>Envolvimento extracutâneo*</i>			
<i>Anemia</i>	Ausente	Variável	Ausente
<i>Retardamento do crescimento</i>	Ausente	Comum	Ausente
<i>Odontológica</i>	Pouco	Comum	Variável
<i>Gastrointestinal</i>	Ausente	2+ (Constipação)	Ausente
<i>Oftalmológico</i>	Ausente	Ausente	Raro

Legenda: AD - Autossômico Dominante; EBS - Epidermólise Bolhosa Simples; * Frequência relativa - ausente; raro; 1+; 2+; 3+; 4+.

Fonte: Fine et al. (2014).

Figura 1: Exemplos de lesões cutâneas em pacientes portadores da EBS.



Legenda: Em **A**, um recém nascido com a forma Generalizada severa, na mão e no pé tem a formação de hiperqueratose (BOEIRA, 2012); **B**, Forma localizada; **C**, Mão de uma criança com a forma Generalizada Intermediária (TITEUX et al., 2006).

3.1. Genes *KRT5* e *KRT14* responsáveis por codificar as queratinas -5 e -14

Os genes *KRT5* e *KRT14* são responsáveis por sintetizar as queratinas 5 do tipo II e queratina 14 do tipo I, respectivamente. Elas constituem um grupo de proteínas fibrosas fortes que formam um quadro estrutural de algumas células como as que estão presentes nas células epiteliais, unhas, cabelo e outros tecidos. Estes genes pertencem à família das queratinas, sendo que existem dois tipos de queratina, as básicas e as proteínas ácidas (LANE; MCLEAN, 2004). As proteínas fibrosas unem-se para formar os filamentos intermediários que podem ser sintetizados por 70 genes diferentes e foram separados em 6 famílias. A primeira família são as queratinas do tipo I (K9 até K23 e K25 até K28) encontradas em tecidos moles e por apresentarem cargas negativas ou neutras são chamadas de ácidas. A segunda é composta pelas queratinas do tipo II (K1 até K8 e K71 até K80) que são as proteínas básicas que geram cargas positivas e também são encontradas em tecidos moles. A tabela 2 representa as seis famílias de proteínas que podem constituir os filamentos intermediários, assim como o tamanho e tecido que são sintetizadas (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009).

Tabela 2: Descrição das principais famílias de proteínas encontrada nos filamentos intermediários.

TIPO	PROTEÍNA	TAMANHO (kD)	LOCAL DE EXPRESSÃO
I	Queratinas ácidas K9 – K23 e K25 – K28	40–60	Células epiteliais
II	Queratinas básicas ou neutras K1 – K8 e K71 – K80	50–70	Células epiteliais
III	Vimentina	54	Fibroblastos/ leucócitos/ outros tipos celulares.
	Desmina	53	Células musculares
	Proteína glia fibrilar ácida	51	Células glia
	Periferina	57	Neurônios periféricos
IV	Proteínas neurofilamentar		
	NF- Baixo peso molecular	67	Neurônios
	NF- Médio peso molecular	150	Neurônios
	NF-Alto peso molecular	200	Neurônios
	α -Internexina	66	Neurônios
V	Proteínas lâminas	60–75	Lâmina nuclear de todas as células
VI	Nestina	200	Células tronco do SNC

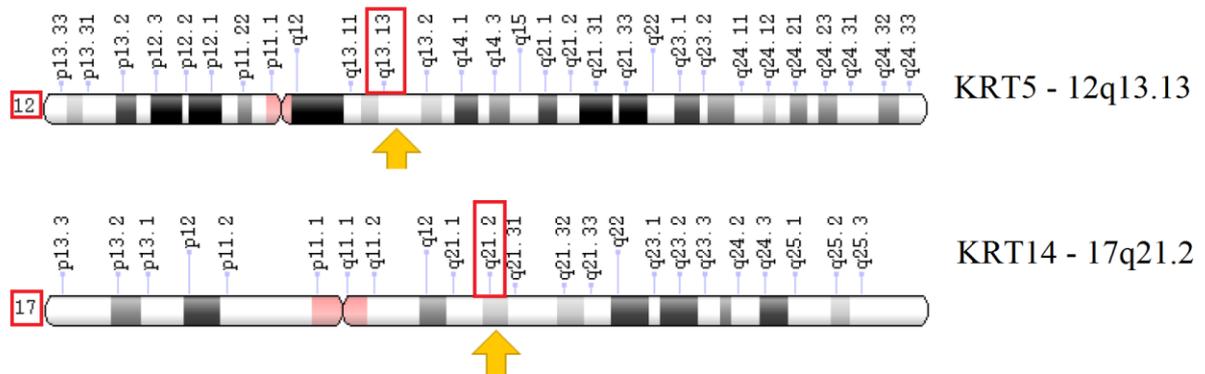
Legenda: NF – Neurofilamento; K - queratina; KD: kilodaltons; SNC - sistema nervoso central.

Fonte: COOPER (2000); BRAGULLA; HOMBERGER (2014).

O ponto isoelétrico (PI) (Ponto que existe um equilíbrio da carga positiva e negativa de uma molécula em uma solução) é o responsável por esta divisão, mesmo com as diferenças de PI, as queratinas básicas e ácidas contêm 30% de aminoácidos e sequências iguais e, também, são observados em outros filamentos intermediários. Como estas diferenças de cargas, os filamentos intermediários terão uma maior estabilidade quando comparadas com os filamentos formados por apenas uma família (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009).

No gene da queratina-5 foram encontradas mais de 100 mutações que causam pelo menos um dos subtipos da EBS e mais de 60 mutações no gene da queratina-14, sendo estas alterações responsáveis por deixar a epiderme frágil e formar bolhas facilmente quando comparadas com as pessoas que possuem queratinas normais. Os genes *KRT5* e *KRT14* estão localizados nos cromossomos 12 e 17 (Figura 2) (GHR, 2016a; GHR, 2016b). A maioria das mutações leva à substituição de aminoácidos, mas o que irá influenciar no subtipo da EBS será o distúrbio causado por essas mudanças durante a montagem da proteína final. O gene da *KRT5* está envolvido com 11 patologias diferentes e 10 doenças relacionadas com o gene da *KRT14* (SZEVERENYI et al., 2008).

Figura 2: Localização citogenética dos genes *KRT5* e *KRT14*.

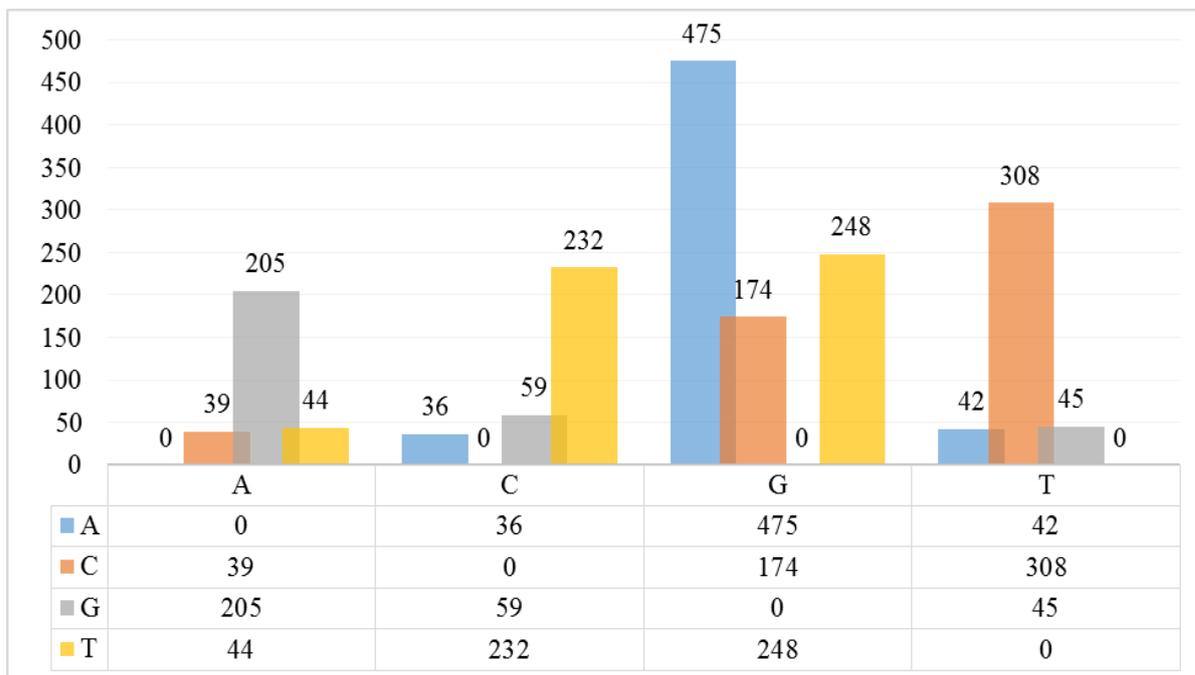


Fonte: GHR (2016A); GHR (2016b).

As principais alterações de nucleotídeos causadas por mutações com as queratinas do tipo I e II estão representadas na figura 3. A principal substituição é uma transição da Adenina (A) para Guanina (G), a segunda transição muda a Citosina (C) para Timina (T), e a terceira é uma transversão da T para G. As substituições do tipo transição são mais frequentes do que transversões pois, as mudanças na estrutura química dos aminoácidos são menos drásticas quando comparadas com as transversões. Não se sabe o fator dessas mutações no DNA, mas a

transição de C para T pode estar relacionada com a desaminação da 5-metilcitosina, que acaba se tornando mais suscetível a desaminação espontânea por causa da instabilidade dos nucleotídeos CpG e formando uma timina (SZEVERENYI et al., 2008).

Figura 3: Principais alterações dos nucleotídeos nas queratinas tipo I e tipo II.



Legenda: Adenina (A); Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T).

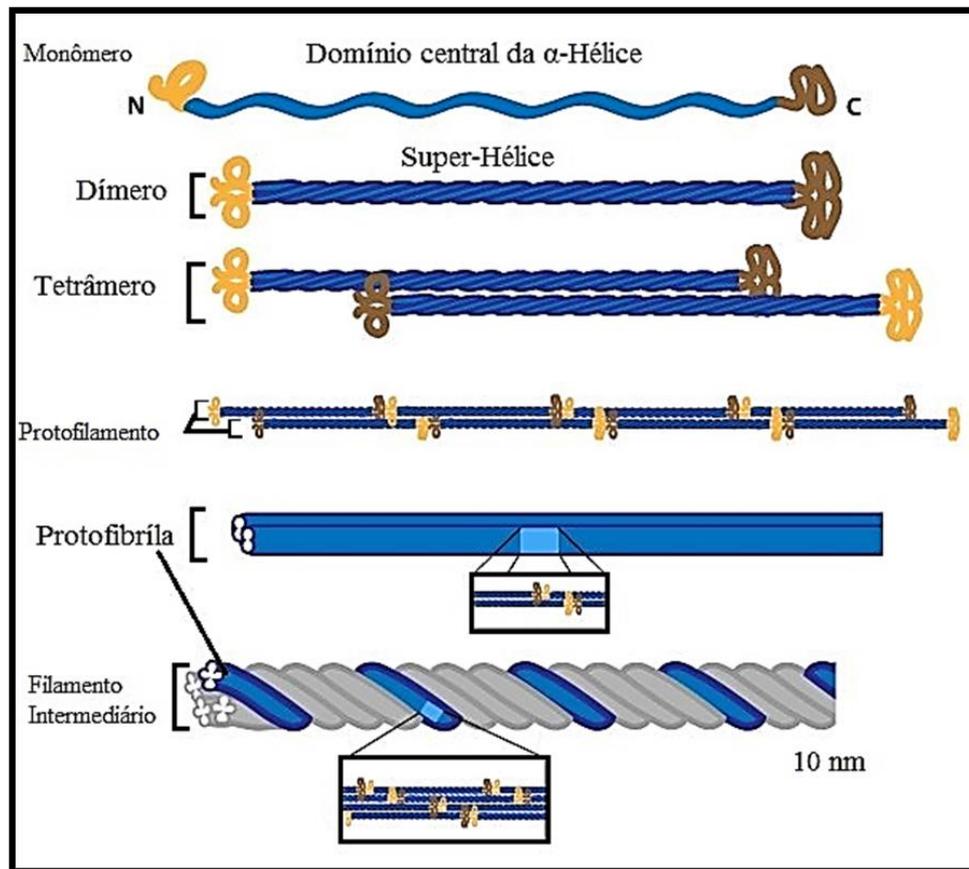
Fonte: Adaptado de SZEVERENYI et al. (2008).

3.2. Queratinas

As queratinas (K) são proteínas que apresentam uma estrutura em α -hélice, assim como outras proteínas capazes de formar os filamentos intermediários. A estrutura final da proteína é formada pela dimerização dos monômeros de K5 e K14 ou por qualquer uma das proteínas citadas anteriormente na tabela 02, responsáveis pela formação dos filamentos intermediários de queratina. Para que ocorra esta dimerização é necessária a interação entre os centros da α -hélice presente nas queratinas, e assim, formando o dímero de K, esta região central é conhecida depois como super-hélice. Em seguida, os dímeros se juntam paralelamente em sentidos opostos e mantendo uma distância entre as regiões C-Terminal e N-Terminal, formando o tetrâmero. Após esta etapa, ocorre a montagem dos protofilamentos que são tetrâmeros ligados pelas extremidades, C e N terminais. Depois tem-se a junção de dois protofilamentos construindo a protofibrila e, para finalizar, ocorre a interação entre

quatro protofibrilas formando o filamento intermediários de queratina (Figura 4) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 4: Montagem do filamento intermediário de queratina.



Legenda: N – porção Amino-terminal; C – porção Carboxi-terminal.

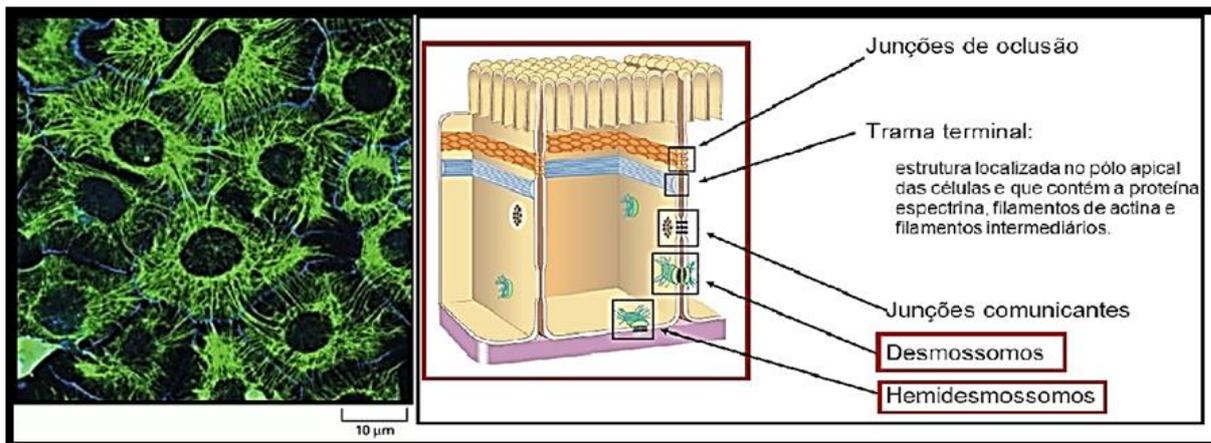
Fonte: Adaptado de PROTEÍNAS (2016).

As interações das queratinas ácidas e básicas geram uma maior estabilidade para os filamentos intermediários quando comparadas com aquelas constituídas por homodímeros, pois as diferenças entre os dois tipos de queratinas apresentam uma maior quantidade de ligações hidrofóbicas, além das interações eletrostáticas das queratinas (LANE; MCLEAN, 2004).

Os filamentos intermediários são distribuídos dentro das células criando uma rede de filamentos conectados. Para que estes filamentos não fiquem soltos no citoplasma, eles são ligados com proteínas aderidas à membrana citoplasmática. Estas proteínas são os desmossomos e hemidesmossomos que irão garantir à adesão entre as células adjacentes e com a lâmina basal. Quando mutações afetam as extremidades dos monômeros, a ligação

entre os tetrâmeros e com as estruturas presentes na membrana células estarão comprometidas e, assim, são fatores importantes no desenvolvimento de patologias (SZEVERENYI et al., 2008; ALMEIDA JR, 2004). A figura 5 mostra a rede de filamentos intermediários, a localização dos desmossomos e hemidesmossomos na célula.

Figura 5: Distribuição da rede de filamentos, desmossomos e hemidesmossomos dentro da célula.



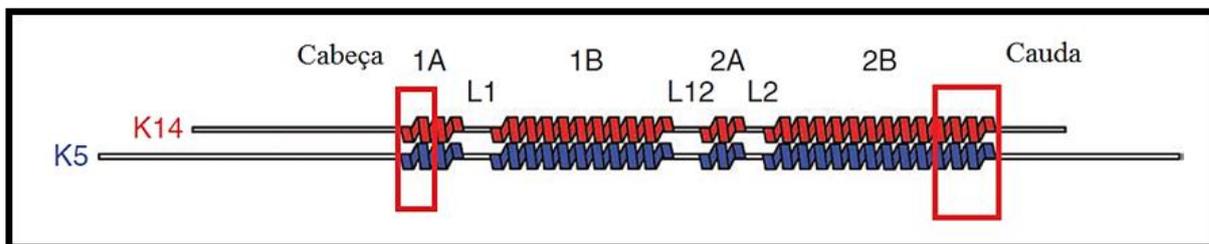
Legenda: Na esquerda a rede de filamentos se apresentam em verde pela técnica de imunofluorescência e, no lado direito a localização das estruturas desmossomos e hemidesmossomos.

Fonte: Adaptado de COOPER (2000); JUNÇÕES (2016).

As estruturas das queratinas são divididas em cabeça, corpo e cauda. O corpo dos filamentos intermediários apresenta um domínio central da α -hélice (1A, 1B, 2A e 2B) que está separado pelos segmentos ligantes não-helicoidais (L1, L12 e L2). Nas extremidades têm a presença dos segmentos variáveis (V1 e V2), responsáveis pela variabilidade observada nas estruturas dos filamentos intermediários e as queratinas básicas possuem os segmentos (H1 e H2), que se encontram entre os segmentos variáveis e domínios helicoidais (Figura 6) (ALMEIDA JR, 2004). Na porção da cabeça e cauda helicoidais dos filamentos intermediários, existem dois locais conservados, o primeiro fica no início do domínio helicoidal 1A (correspondendo 23 aminoácidos) e o segundo são os 32 aminoácidos finais do segmento helicoidal 2B. Estas regiões são consideradas críticas por representarem os locais de interações entre as extremidades dos heterodímeros de queratina. Modificações nas partes conservadas tendem a expressar o fenótipo mais severo da EBS e são chamadas de *hotspots*,

porque são pontos dentro da molécula de DNA que apresentam maior probabilidade de sofrer mutações do que outras regiões (JEŘÁBKOVÁ et al., 2010).

Figura 6: Estrutura das proteínas queratina-5 e -14.



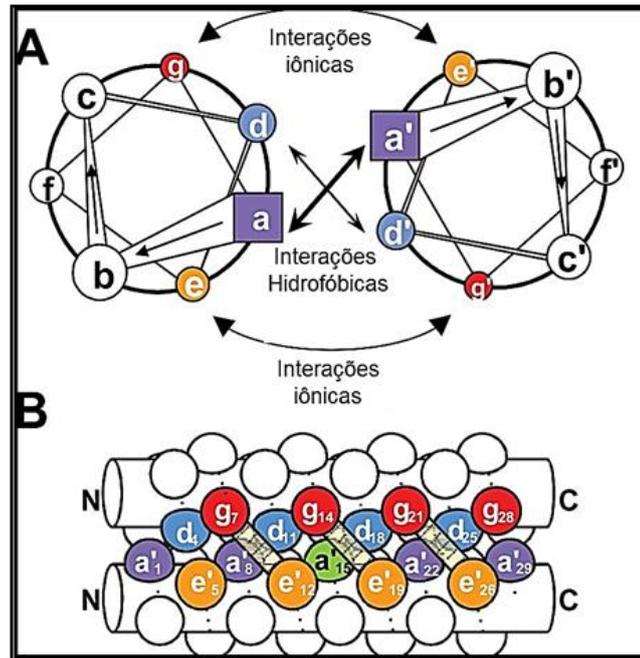
Legenda: K5 – queratina 5; K14 – queratina 14; as regiões marcadas representam os dois locais conservados envolvendo as duas proteínas.

Fonte: Adaptado de LEE et al. (2012).

Para que haja formação das estruturas em α -hélice é necessário que tenha a repetição de sete aminoácidos (repetições *hepta*). Sendo importante nas interações entre os domínios helicoidais da K5 e K14 para que tenha a formação da super-hélice. Essas repetições são representadas como (a – b – c – d – e – f – g) na primeira hélice, e na segunda como (a' – b' – c' – d' – e' – f' – g'). Os aminoácidos normalmente encontrados nas posições a e d possuem características químicas apolares e localizados na interface da super-hélice. Os resíduos e e g são polares e voltados para o lado do solvente, responsáveis por aumentar a especificidade nas interações eletrostáticas entre as hélices (LEE et al., 2012).

A formação de uma super-hélice entre duas α -hélices, normalmente segue os três princípios propostos pela hipótese do velcro de peptídeo. Primeiro, os resíduos (a e d) precisam ser hidrofóbicos como, por exemplo, isoleucina, leucina ou valina, sendo que a quantidade de interações hidrofóbicas aumenta a estabilidade e facilita no processo de dimerização da super-hélice. Segundo, os resíduos (e e g) apresentam os aminoácidos glutamato e lisina respectivamente, que serão responsáveis pelas interações iônicas entre proteínas. Terceiro, os resíduos (b, c e f) precisam ser hidrofílicos já que estão em contato direto com o solvente, e são responsáveis pela montagem da α -hélice devido as interações intramoleculares, formando ligações de hidrogênio. As posições (a – d – e – f) são responsáveis pelas interações intermoleculares que vão montar a super-hélice (Figura 7). Cada repetição *hepta* corresponde uma α -hélice com duas voltas (MASON; ARNDT, 2004).

Figura 7: Padrão de montagem das super-hélices de queratina mostrando as repetições do Heptad.



Legenda: (A) vista inferior da proteína –interações hidrofóbicas entre os resíduos da proteína (a, a') e (d, d'), interações iônicas (e, g'). (B) vista lateral da proteína - Cores, a (roxo), d (azul), e (laranja) e g (vermelho), a estrutura em verde no meio representa um resíduo polar responsável por ligações específicas.

Fonte: Adaptado de MASON; MÜLLER; ARNDT (2008).

3.3. Bioinformática

Na bioinformática, as sequências dos genes utilizadas foram adquiridas pelo banco de dados, NCBI, e correspondem ao número de chamada, NM_000424.3 para o gene *KRT5* e NM_000526.4 para o gene *KRT14*. Foram feitas duas árvores filogenéticas, uma para cada gene, usando a ferramenta BLAST do NCBI, no intuito de observar a distância entre as sequências escolhidas com outras sequências dos mesmos genes depositadas no NCBI, separadamente (Figura 8 e 9). As sequências dos genes escolhidos também foram utilizadas para analisar as estruturas das proteínas K5 e K14 (ZHANG et al., 2000).

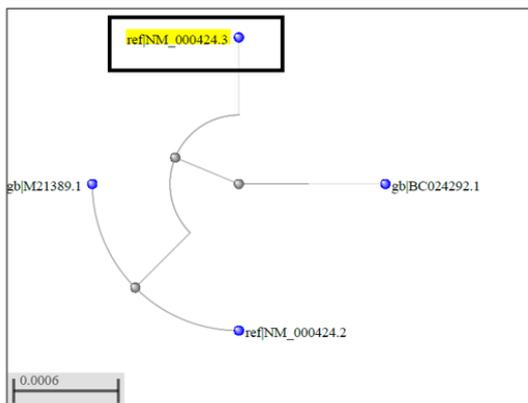
Como não foram encontradas informações relacionadas às principais mutações da EBS, o site *Human Intermediate Filament Database* (HIFD) foi utilizado como base para selecionar algumas mutações. Os critérios utilizados para a escolha das mutações foram: as principais alterações dos nucleotídeos e aminoácidos; domínio da proteína mais afetado; e pela disponibilidade de um modelo no SWISS-MODEL (Figuras 3, 10 e 11). As mutações

escolhidas descritas no gene *KRT5* foram: nucleotídeo A1210G, aminoácido K404Q; nucleotídeo C1283T, aminoácido A428V; nucleotídeo 1285_1299del15, aminoácido R429_A433del; E para o gene *KRT14* foram: nucleotídeo C1228T, aminoácido Q410X; nucleotídeo T1243C, aminoácido Y415H (SZEVERENYI et al., 2008).

Figura 8: Alinhamento e árvore filogenética circular do gene *KRT5*.

NM_000424.3	361	CAACCTGGGGGGCTCCAAGAGGATATCCATCAGCACTAGTGGTGGCAGCTTCAGGAACCG	420
M21389.1	589	CAACCTGGGGGGCTCCAAGAGGATATCCATCAGCACTAGAGGAGGCAGCTTCAGGAACCG	648
NM_000424.2	361	CAACCTGGGGGGCTCCAAGAGGATATCCATCAGCACTAGAGGAGGCAGCTTCAGGAACCG	420
BC024292.1	285	CAACCTGGGGGGCTCCAAGAGGATATCCATCAGCACTAGTGGTGGCAGCTTCAGGAACCG	344

NM_000424.3	1741	AGGTAGCAGTGAAGCTACTACTCCAGCAGCAGTGGGGGTGTCGGCCTAGGTGGTGGGCT	1800
M21389.1	1969	AGGTAGCAGTGAAGCTACTACTCCAGCAGCAGTGGGGGTGTCGGCCTAGGTGGTGGGCT	2028
NM_000424.2	1741	AGGTAGCAGTGAAGCTACTACTCCAGCAGCAGTGGGGGTGTCGGCCTAGGTGGTGGGCT	1800
BC024292.1	1665	AGGTGGCAGTGAAGCTACTACTCCAGCAGCAGTGGGGGTGTCGGCCTAAGTGGTGGGCT	1724



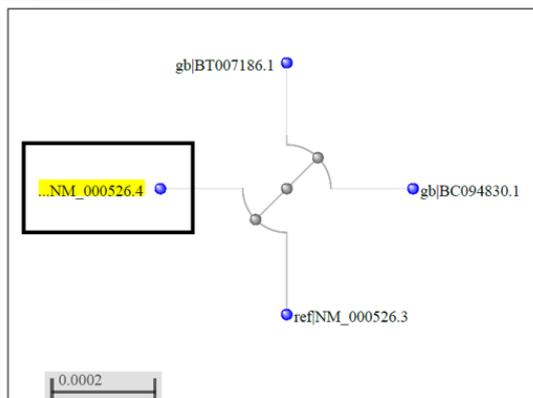
KRT5

Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2000).

Figura 9: Alinhamento e árvore filogenética circular do gene *KRT14*.

NM_000526.4	61	CATGACCACCTGCAGCCGCCAGTTCACCTCCTCCAGCTCCATGAAGGGCTCCTGCGGCAT	120
BT007186.1	1	ATGACCACCTGCAGCCGCCAGTTCACCTCCTCCAGCTCCATGAAGGGCTCCTGCGGCAT	59
BC094830.1	52	CATGACCACCTGCAGCCGCCAGTTCACCTCCTCCAGCTCCATGAAGGGCTCCTGCGGCAT	111
NM_000526.3	61	CATGACTACCTGCAGCCGCCAGTTCACCTCCTCCAGCTCCATGAAGGGCTCCTGCGGCAT	120

NM_000526.4	301	TGGTAGTGGCTTTGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTGTGGCTTGGGTGGTGGCTT	360
BT007186.1	240	TGGTAGTGGCTTTGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTACTGGCTTGGGTGGTGGCTT	299
BC094830.1	292	TGGTAGTGGCTTTGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTACTGGCTTGGGTGGTGGCTT	351
NM_000526.3	301	TGGTAGTGGCTTTGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTGTGGCTTGGGTGGTGGCTT	360



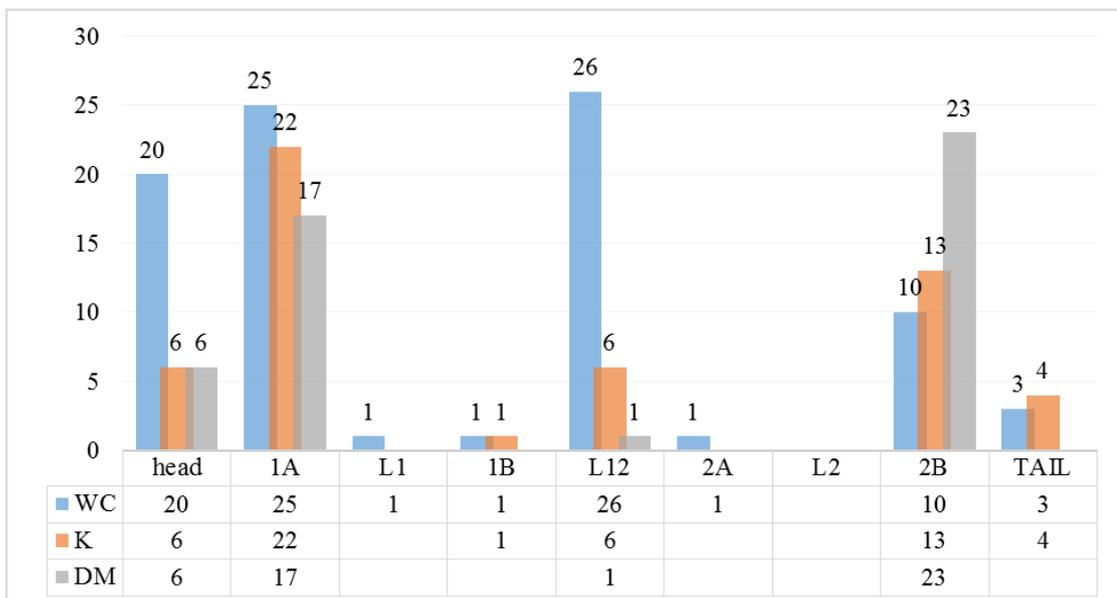
KRT14

Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2000).

Os resultados das árvores filogenética foram de 0,0006 para o gene *KRT5* e 0,0002 para *KRT14* usando o método da distância de evolução mínima, com uma distância máxima de 0,75. Para chegar nestes valores as quatro sequências gênicas foram alinhadas e somado os nucleotídeos que são diferentes das sequências que estão marcadas. Em seguida, o número de nucleotídeos diferentes foi dividido pelo número total de nucleotídeos das sequências gênicas marcadas. O resultado representa o comprimento entre as sequências alinhadas. Portanto, as sequências dos genes *KRT5* e *KRT14* que estão marcadas apresentam uma distância de 0,0006 e 0,0002 até o ponto mais próximo da uma última ramificação. Os eventos que causaram estas ramificações tornaram as sequências NM_000424.3, NM_000526.4 e variantes suscetíveis para sofrerem mutações que causam à EBS (SEIDEL et al., 2008).

Nas figuras 10 e 11 foi observado que a maioria das mutações se encontram nos domínios helicoidais 1A, 2B e L12 no domínio não helicoidal. Sendo que as principais mutações no gene da *KRT5* ocorreram nos domínios L12, 1A e 2B, causando os subtipos da EBS-Localizada, Generalizada Intermediária e Severa, respectivamente. Enquanto que no gene da *KRT14* foram nos domínios 1A para EBS-generalizada Severa e 2B para os subtipos EBS-Localizada e Generalizada Intermediária (SZEVERENYI et al., 2008).

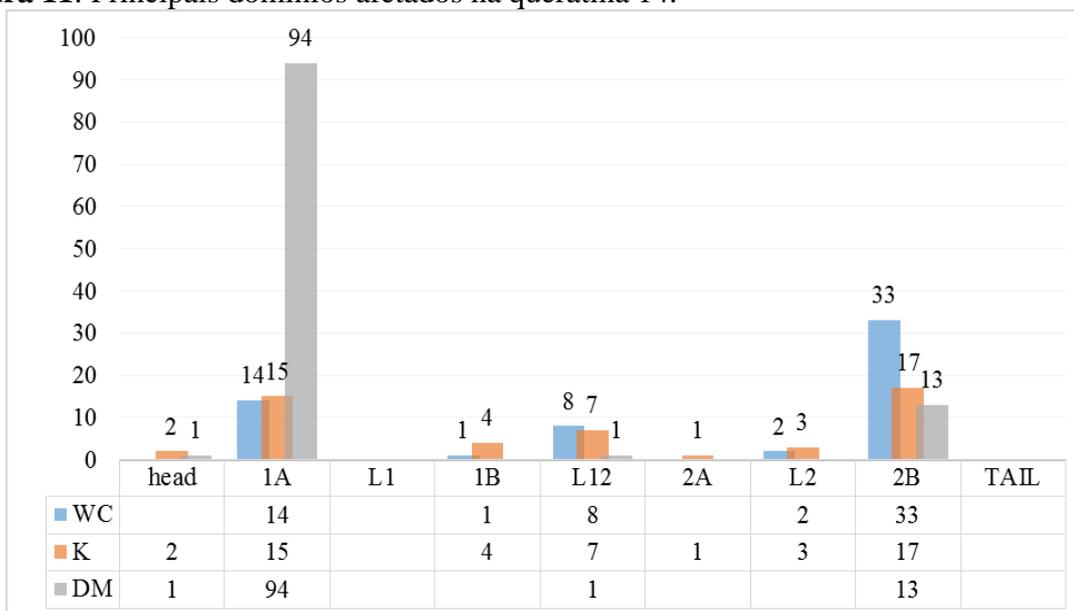
Figura 10: Principais domínios afetados na queratina 5.



Legenda: WC – Localizada; K – Generalizada Intermediária; DM – Generalizada Severa.

Fonte: Adaptado de SZEVERENYI et al. (2008).

Figura 11: Principais domínios afetados na queratina 14.



Legenda: WC – Localizada; K – Generalizada Intermediária; DM – Generalizada Severa.

Fonte: Adaptado de SZEVERENYI et al. (2008).

Para a construção das estruturas protéicas tridimensionais podem ser utilizados dois métodos diferentes: o primeiro é por abordagem experimental, *Ressonância Magnética Nuclear* (RMN), *Cristalografia de Raio-X* ou *Microscopia crioeletrônica*, sendo que no final, os resultados serão depositados em bancos de dados como do PDB e disponíveis para serem visualizados em programas específicos. A vantagem desta metodologia é por apresentar uma grande precisão na predição das estruturas, mas existem dificuldades na obtenção de amostras suficientes para o experimento, resultados sem qualidade, o método é de difícil realização além de ser uma técnica que demanda muito tempo (PACHECO, 2009).

O segundo método é a abordagem computacional, formado pela *modelagem por homologia*, *Threading* e *Ab initio*. Nestes métodos utilizam-se as sequências provenientes da abordagem experimental, que foram depositadas nos bancos de dados, nos quais serão comparados a uma sequência “problema”, se a sequência existente com uma similaridade de 25% ou maior pode usar modelagem por homologia, mas quando apresentam menos que 25% a melhor forma de analisar será pela compatibilidade da sequência-estrutura, *Threading*, que é a escolha do melhor modelo ou pela *Ab initio* que usam métodos quânticos para elucidar a estrutura por emissão de ondas moleculares geradas pela distribuição dos núcleos atômicos e elétrons em torno dessas moléculas (PACHECO, 2009; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). A elucidação da proteína normal vai ajudar na compreensão das alterações causadas por mutações e, assim, analisar as possíveis mudanças ou perda da função proteica (DIAS; TAVEIRA, 2011).

3.3.1. Modelagem Molecular por Homologia

A modelagem por homologia está embasada na evolução molecular pela divergência dos genes conforme duplicação e associação com as mutações e, a partir destas modificações são gerados dados a respeito da formação das famílias de genes. Sendo que as proteínas vão apresentar regiões homólogas, domínios conservados e regiões muito variáveis. As mudanças nas proteínas homólogas podem ser idênticas, semelhantes ou dissemelhantes, mas, mesmo com estas diferenças, a estrutura tridimensional das proteínas se mantém, pois, a forma ancestral é importante para exercer a função normalmente (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). Na modelagem por homologia é usado um molde para se comparar com a sequência problema e prever uma estrutura tridimensional com um grau de similaridade entre as duas moléculas. Isso vai garantir uma fidelidade da estrutura é o nível de similaridade entre as duas, mas quando se busca uma variação anormal na proteína, pode-se modificar a sequência e observar o efeito dessa diferença (SOUZA, 2008).

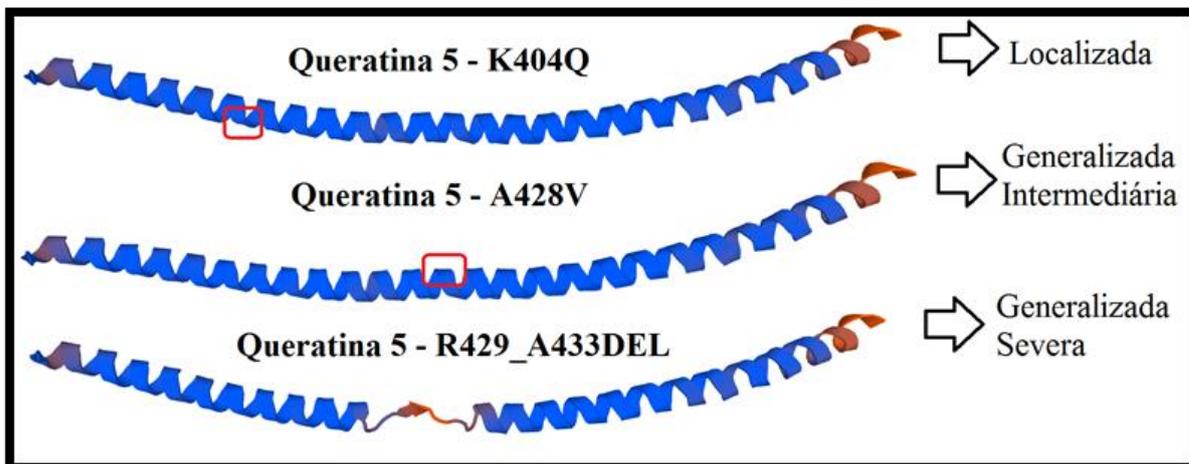
Os domínios da α -hélice 2B das queratina-5 e -14 foram construídas pela modelagem por homologia no programa SWISS-MODEL, no qual as sequências foram simuladas com e sem mudanças. As mudanças neste domínio estavam ligadas com o desenvolvimento da EBS (BIASINI et al., 2014).

O domínio 2B da queratina-5 começa na posição 350 até 477 e contém 131 aminoácidos. A partir dessa informação, foram feitas alterações na sequência peptídica que representa as três mutações escolhidas. As duas primeiras mutações substituíram uma lisina por uma glutamina na posição 404 e a outra uma alanina pela valina na posição 428 no domínio 2B da proteína, mas não apresentaram uma mudança na proteína. Já na terceira mutação ocorreu uma deleção da posição 429 até a posição 433, e foi observada a formação de uma folha-beta pregueada que normalmente era representada por uma α -hélice (Figura 12). O domínio 2B da queratina-14 inicia na posição 295 até a posição 422 e foram inseridas 2 mutações diferentes em duas sequências separadas, a primeira mutação era representada por um códon de parada na posição 410, normalmente ocupado pela glutamina e, assim, diminuindo o tamanho do domínio 2B. A segunda mutação substituiu a tirosina na posição 415 por uma histidina, mas não apresentou uma mudança estrutural (Figura 13) (ARNOLD et al., 2006; SZEVERENYI et al., 2008).

As alterações dos aminoácidos ou deleções no domínio 2B tiveram mudanças perceptíveis em algumas mutações, mas aqueles que não mudaram a conformação estrutural da proteína, têm a capacidade de modificar as interações intermoleculares, sendo que a

dimerização das queratinas depende muito destas interações. Mesmo pequenas alterações nos domínios podem causar alterações significativas para desenvolver alguma patologia (RUGG et al., 2007).

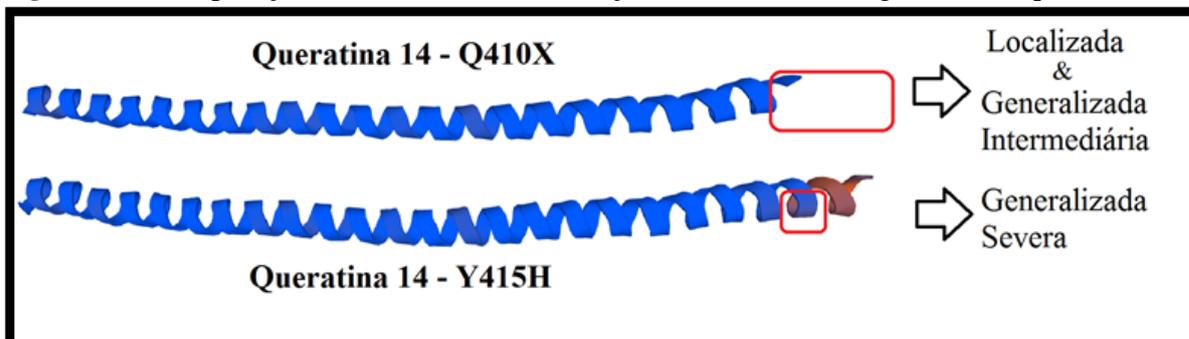
Figura 12: Comparação das diferentes mutações ocorrendo na região 2B da queratina-5.



Legenda: Modelo construído pelo programa SWISS-MODEL.

Fonte: BIASINI et al. (2014).

Figura 13: Comparação do efeito de duas mutações ocorrendo na região 2B da queratina-14.



Legenda: Modelo construído pelo programa SWISS-MODEL.

Fonte: BIASINI et al. (2014).

3.4. Associação do genótipo com o fenótipo.

Os resultados das mutações escolhidas para a K5 apresentam os seguintes fenótipos: a primeira mutação, L404Q representou o subtipo Localizada; a mutação A428V, a forma Generalizada Intermediária; e na terceira mutação ocorreu à deleção de cinco aminoácidos a partir da posição 429 até 433 que foi representado pela forma Generalizada Severa. Os fenótipos das duas mutações na K4 foram: A primeira mutação representou dois fenótipos, o subtipo Localizada e a forma generalizada intermediária, essa mutação da posição 1228 mudou o códon da glutamina para um códon de parada, o que interrompeu a síntese da

proteína a partir da posição 410; a última mutação, Y415H, conduziu para o fenótipo mais severo da EBS (Generalizada Severa) (SZEVERENYI et al., 2008). A tabela 3 representa uma lista de possíveis mutações para serem utilizadas no SWISS-MODEL e, em negrito estão as mutações escolhidas para o experimento de bioinformática.

Tabela 3: Lista das principais mutações descritas nos genes *KRT5* e *KRT14* e os fenótipos correlacionados.

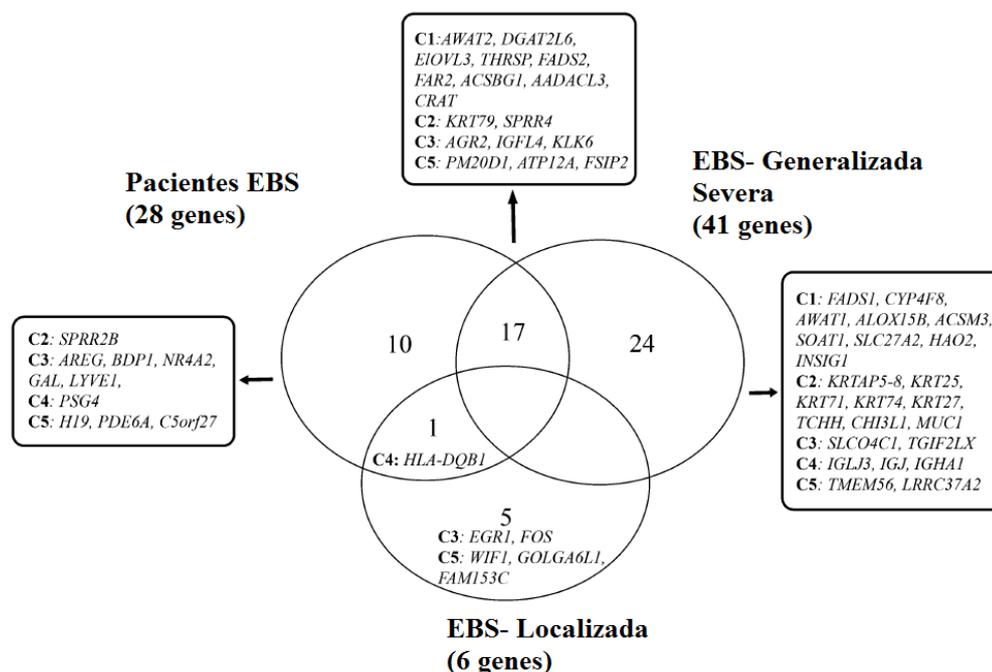
Gene	Nucleotídeo	Mutação	Amino-Ácido	Mutação	Domínio	Subtipo	Autores
<i>KRT5</i>	A1210G	Substituição	K404Q	Substituição	2B	Localizada	Schuilenga-Hut et al., 2003.
	C1283T	Substituição	A428V	Substituição	2B	Generalizada I	Rugg et al., 2007.
	1285_1299de115	Deleção	R429_A433del	Deleção	2B	Generalizada S	Kemp et al., 2005.
	T605A	Substituição	L202Q	Substituição	1A	Localizada	Gao et al., 2015.
	T932G	Substituição	L311R	Substituição	1B	Localizada	Ciubotaru et al., 2003.
	C1054A	Substituição	R352S	Substituição	2A	Localizada	Yasukawa et al., 2006.
	G508A	Substituição	E170K	Substituição	1A	Generalizada I	Óldak et al., 2011.
	G794C	Substituição	R265P	Substituição	1B	Generalizada I	Kang et al., 2010.
	G506C	Substituição	R169P	Substituição	1A	Generalizada S	Müller et al., 2006.
<i>KRT14</i>	C1228T	Substituição	Q410X	Substituição	2B	Generalizada I; Localizada	Arin et al., 2010.
	T1243C	Substituição	Y415H	Substituição	2B	Generalizada S	Arin et al., 2010.
	?	Desconhecido	M119I	Desconhecido	1A	Localizada	Chen et al., 1995.
	740_748delCTACCTGAinsGAA	Indel	A247_K250delinsE	Indel	1B	Localizada R; Localizada	Bolling et al., 2011.
	A346G	Substituição	L116E	Substituição	1A	Generalizada I	Rugg et al., 2007.
	G863T	Substituição	R288L	Substituição	2A	Generalizada I	Minakawa et al., 2013.
	G348C	Substituição	K116N	Substituição	1A	Generalizada S	Sørensen et al., 1999.

Legenda: Del – Deleção; Ins – Inserção; Generalizara I – Intermediária; Generalizada S – Severa; A – adenina; C – citosina; T – timina; G – Guanina; R – arginina.

Fonte: Adaptado de SZEVERENYI et al. (2008).

Foi observado que as mutações dos genes *KRT5* e *KRT14* apresentam efeitos estruturais patogênicos diferentes entre os subtipos e que estas proteínas modificadas alteram o metabolismo dos queratinócitos, mas não está bem esclarecido como ocorrem essas alterações em termos celulares e teciduais. Alguns estudos demonstraram que a expressão de alguns genes foi alterada por causa das mutações nos genes das proteínas K5 e K14. Em 2011, foi realizado um estudo no Canadá com objetivo de observar, o perfil da expressão gênica de 6 pacientes diagnosticados com EBS e selecionou 6 pessoas saudáveis com as mesmas características (altura, peso e idade aproximada de 3 anos de diferença) para ser o controle de cada paciente. Sendo que 2 pacientes apresentavam o subtipo (EBS-Generalizada Severa) e 4 pacientes com o subtipo mais brando (EBS-Localizada). Primeiro foi observada uma diferença na expressão de 28 genes em pacientes com EBS (contando os dois subtipos) quando comparados com os indivíduos controle. As diferenças no perfil de expressão entre os pacientes (EBS-Generaliza Severa ou EBS-Localizada) com os indivíduos controle foram 41 e 6 genes, respectivamente. Foram observadas alterações na expressão de 17 genes entre os pacientes com EBS e EBS- Generaliza Severa e apenas um gene com os pacientes EBS e EBS-localizada (Figura 14) (BCHETNIA et al., 2011).

Figura 14: Estudo da alteração de expressão provocado por diferentes mutações nos genes *KRT5* e *KRT14*.



Legenda: EBS – Epidermólise Bolhosa Simples; C1 – Genes dos no processo de biossíntese de lipídios; C2 – Genes envolvidos com a queratinização; C3 – Genes do crescimento e proliferação celular; C4 – Genes da resposta imune; C5 – Outras funções.

Fonte: BCHETNIA et al. (2011).

A importância de elucidar a estrutura tridimensional dessas proteínas ajuda no desenvolvimento de fármacos inteligentes, permitindo que outros programas sejam capazes de observar, as possíveis interações entre a proteína alvo com o fármaco terapêutico, além de minimizar os efeitos colaterais ou maximizar os mecanismos de reparo celular. A criação de novos algoritmos computacionais (conjunto de instruções para solucionar um problema) pode ajudar a desenvolver novos métodos de diagnóstico ou melhorar os métodos conhecidos. Para que tenha o desenvolvimento de fármacos específicos para a EBS, é necessário que tenha descoberta de uma molecular capaz de interagir com a proteína e melhorar à estabilidade, evitando a lise celular. Uma outra forma de melhorar o tratamento da patologia, seria a capacidade do fármaco controlar a expressão dos genes causada por mutações nos genes *KRT5* e *KRT14* (OLIVA, 2008).

4. Considerações Finais

A Epidermólise Bolhosa Simples é causada por mutações nos genes codificadores das queratinas do tipo 5 e 14, que formam um heterodímero importante para a formação do filamento intermediário de queratina.

Para fazer a simulação das proteínas na bioinformática, foi necessário a busca das sequências gênicas dos genes *KRT5* e *KRT14*, e selecionar um modelo alvo compatível para simular as mutações que causam os principais subtipos da Epidermólise Bolhosa Simples (EBS). Após observar as alterações nas estruturas tridimensionais das K5 e K14 pelo SWISS-MODEL, foi possível demonstrar mutações que ocorrem em locais específicos dos genes, responsáveis por um subtipo da EBS e que as interações intermoleculares e intramoleculares são importantes para manter a estrutura tridimensional e conservar a função normal das proteínas.

A predição das estruturas e funções das proteínas podem ser usadas para o desenho de fármacos, direcionados contra as alterações em proteínas, utilizando programas de bioinformática, por serem capazes de simular as interações entre o fármaco e o alvo terapêutico. Como esta é uma área relativamente nova, ela possui o potencial de ser aplicada em diversas áreas voltadas para a bioquímica e biologia molecular, sendo que na área da saúde, o principal objetivo é melhorar a qualidade de vida de paciente com doenças genéticas até pelas patologias causadas por agentes físicos, químicos e biológicos.

5. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. Imunidade inata, A defesa inicial contra as infecções. In: ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 23-43.

ALMEIDA JR, H. L. Genética Molecular das Epidermólises Bolhosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 519-532, set./out. 2002.

ALMEIDA JR, H. L. Citoqueratinas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.2, p. 135-145, mar./abr. 2004.

ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics (Oxford, England)**, Oxford, v. 15-22, n. 2, p. 195-201, jan. 2006.

ARIN, M. J. et al. Identification of novel and known KRT5 and KRT14 mutations in 53 patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 162, n. 6, p. 1365-9, jun. 2010.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 42 n. (W1): W252-W258, abri. 2014.

BOEIRA, V. L. S. Y. **Epidermólise Bolhosa Hereditário: Uma Revisão de Literatura**. 2012. 42 f. Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

BOLLING, M. C. et al. Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 164, n. 3, p. 637-644, mar. 2011.

BRAGULLA, H. H; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of anatomy**, Londres, v. 214, n. 4, p. 516-59, abr. 2009.

BCHETNIA, M. et al. Expression signature of epidermolysis bullosa simplex. **Human genetics**, Berlin, v. 131, n. 3, p. 393-406, mar. 2012.

CHEN, H. et al. Keratin 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 105, n. 4, p. 629-32, out. 1995.

CIUBOTARU, D. et al. Epidermolysis bullosa simplex in Israel: clinical and genetic features. **Archives of dermatology**, Chicago, v. 139, n. 4, p. 498-505, apr. 2003.

COOPER, M. P. **The cell: A molecular approach**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>> acesso em: 20 de maio de 2016.

DIAS, S. F; TAVEIRA, C. C. Homologia de proteínas como ferramenta na construção de novos fármacos. **Cenarium Farmacêutico**, Brasília, Ano 4, nº 4, ISSN: 1984-33801, Maio/Nov 2011.

FINE, J. D. Inherited epidermolysis bullosa. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, Paris, v. 5, n. 12, p. 1-17, maio. 2010.

FINE, J. D. et al. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 70, n. 6, p. 1103-26, jun. 2014.

GARCÍA, M. et al. Two novel recessive mutations in KRT14 identified in a cohort of 21 Spanish families with epidermolysis bullosa simplex. **The British journal of dermatology**, Inglaterra, v. 165, n. 3, p. 683-92, set. 2011.

GAO, Y. et al. A novel large deletion mutation of FERMT1 gene in a Chinese patient with Kindler syndrome. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, Hangzhou, v. 16, n. 11, p. 957-62, nov. 2015.

GHR – Genetics Home Reference. **KRT5**. 2016. Disponível em: < <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRT5>>. Acesso em 20 maio de 2016a.

GHR – Genetics Home Reference. **KRT14**. 2016. Disponível em: < <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRT14>>. Acesso em 20 maio de 2016b.

GHR – Genetics Home Reference. **Junctional epidermolysis bullosa**. 2015. Disponível em: < <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/junctional-epidermolysis-bullosa>> Acesso em 26 de out. de 2015a.

GHR – Genetics Home Reference. **Dystrophic epidermolysis bullosa**. 2015. Disponível em: < <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/dystrophic-epidermolysis-bullosa>> Acesso em 26 de out. de 2015b.

JEŘÁBKOVÁ, B. et al. Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. **The British journal of dermatology**, Inglaterra, v. 165, n. 5, p. 1004-13, maio. 2010.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. O Citoplasma. In: JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 23-51.

JUNÇÕES. **Junções celulares**. 2016. Disponível em: < http://images.slideplayer.com.br/1/340412/slides/slide_44.jpg, > acesso em 21 de maio de 2016.

KANG, T. W. et al. Novel and recurrent mutations in Keratin 5 and 14 in Korean patients with Epidermolysis bullosa simplex. **Journal of dermatological science**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 90-4, fev. 2010.

KEMP, M. W. et al. A novel deletion mutation in keratin 5 causing the removal of 5 amino acids and elevated mutant mRNA levels in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 124, n. 5, p. 1083-5, maio. 2005.

LANE, E. B; MCLEAN, W. H. I. Keratins and skin disorders. **Journal of Pathology**, Londres, v. 204, n. 4, p. 355-66, nov. 2004.

LEE, C. H. et al. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. **Nature structural & molecular biology**, Nova York, v. 17;19, n. 7, p. 707-15, jun. 2012.

LIOVIC, M. et al. A mutation (N177S) in the structurally conserved helix initiation peptide motif of keratin 5 causes a mild EBS phenotype. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v.13, n.5, p. 332-334, mai. 2004.

MACHADO, A. B. et al. Hiperqueratose palmo-plantar epidermolítica (Vörner) Relato de caso e revisão da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 593-603, set./out. 2002.

MASON, J. D; ARNDT, K. M. Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, Weinheim, v. 65, n. 2, p. 170-6, fev. 2004.

MASON, J. D; ARNDT, K. M. iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function. **Biochemical Society transactions**, Londres, v. 36, n. 6, p. 1442-7, dez. 2008.

MINAKAWA, S. et al. Mutational analysis on 16 Japanese population cases with epidermolysis bullosa simplex. **Journal of dermatological science**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 330-2, dez. 2013.

MÜLLER, F. B. et al. Novel and recurrent mutations in keratin KRT5 and KRT14 genes in epidermolysis bullosa simplex: implications for disease phenotype and keratin filament assembly. **Human mutation**, Nova York, v. 27, n. 7, p. 719-20, jul. 2006.

OLIVA, G. Bioinformática: Perspectivas na Medicina. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 78, n. 1, p. 52-58, jan. 2008.

OLDAK, M. et al. Novel sporadic and recurrent mutations in KRT5 and KRT14 genes in Polish epidermolysis bullosa simplex patients: further insights into epidemiology and genotype-phenotype correlation. **Journal of Applied Genetics**, Pozan, v. 57, n. 1, p. 175-181, jan. 2016.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzimalanosterol 14A-desmetilase do Moniliophthora pernicioso**. 2009. 93 f. Dissertação (pos-graduação) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

PROTEÍNAS. **Proteínas de Filamentos Intermediários**. 2016. Disponível em: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Prote%C3%ADnas+de+Filamentos+Intermediarios&lang=2> acesso em: 20 de maio de 2016.

RUGG, E. L. et al. Epidermolysis Bullosa Simplex in Scotland Caused by a Spectrum of Keratin Mutations. **Journal of Investigative dermatology**, Baltimore, v. 127, n. 3, p. 547-80 mar. 2007.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA, **Química Nova**, São Paulo, v. 26 n. 2, p. 253-259, Mar./ Apr. 2003.

SCHUILENGA-HUT, P. H. et al. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. **Human mutation**, Nova York, v. 21, n. 4, p. 477, abr. 2003.

SEIDEL, E. J. et al., Comparação entre o método Ward e o método K-médias no agrupamento de produtores de leite. **Ciência e Natureza**. Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 7-15, jan. 2008.

SOUZA, M. L. **Modelagem por Homologia de Estruturas Protéicas do Veneno de Apis mellifera**. 2008. 72f. Dissertação (Graduação) de Informática Biomédica Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SØRENSEN, C. B. et al. Identification of novel and known mutations in the genes for keratin 5 and 14 in Danish patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 112, n. 2, p. 184-90, fev. 1999.

SZEVERENYI, I. et al. The Human Intermediate Filament Database: Comprehensive Information on a Gene Family Involved in Many Human Diseases. **Human mutation**, Nova York, v. 29, n. 3, p. 351-60, mar. 2008.

TITEUX, M. et al. Three Severe Cases of EBS Dowling-Meara Caused by Missense and Frameshift Mutations in the Keratin 14 Gene. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 126, n. 4, p. 773-6, abr. 2006.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. Ed. São Paulo: SBBq, 2014.

YASUKAWA, K. et al. Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean patients: genetic studies in 19 cases. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 155, n. 2, p. 313-7, ago. 2006.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, Nova York, v. 7, n. 1-2, p. 203-14, fev./abr. 2000.