

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA**

**SÍNDROME DE KINDLER: IDENTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
GENÉTICAS E ESTRUTURAIS EM PACIENTES DO SUL DO BRASIL.**

**BEATRIZ CASTELLAR DE FARIA MARTIGNAGO**

**Orientadora: Tania Ferreira Cestari**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Porto Alegre - Brasil**

**2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA

**SÍNDROME DE KINDLER: IDENTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
GENÉTICAS E ESTRUTURAIS EM PACIENTES DO SUL DO BRASIL.**

BEATRIZ CASTELLAR DE FARIA MARTIGNAGO

Orientadora: Tania Ferreira Cestari

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“A apresentação desta dissertação é uma exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título do mestre.”

Porto Alegre - Brasil

2007

**M378s** Martignago, Beatriz Castellar de Faria

Síndrome de Kindler: identificação das alterações genéticas e estruturais em pacientes do sul do Brasil./ Beatriz Castellar de Faria Martignago ; orient. Tania Ferreira Cestari. – 2007.

75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Síndrome de Kindler 2. Dermatopatias genéticas 3. Epidemiologia 4. Transtornos de fotossensibilidade 5. Brasil I. Cestari, Tania Ferreira II. Título.

NLM: WR 218

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivone e Américo, por permitirem e oportunizarem meu crescimento e minha independência. As minhas avós, Conceição e Simone, pelas palavras e atitudes positivas. A minha irmã Bianca, pela amizade, estímulo e amor incondicional. Ao meu marido Paulo, pelo incentivo, apoio e compreensão e finalmente ao meu filho, Henrique, que representa minha maior fonte de inspiração, fazendo aflorar o que há de melhor em mim.

## AGRADECIMENTOS

O trabalho produzido nessa dissertação foi realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no *Genetic Skin Disease Group, St John's Institute of Dermatology, St Thoma's Hospital*, Londres.

À professora Doutora Tania Ferreira Cestari, pelo estímulo, pela amizade, pela orientação, pelo exemplo pessoal e profissional, serei eternamente grata pelos sucessivos votos de confiança e pelo imenso crescimento. Muito obrigada. Durante nossa convivência, aprendi a buscar meus sonhos e a valorizar a importância e a necessidade do trabalho sério e constante. Tenho muito orgulho de ter como orientadora um exemplo de profissional, de pesquisadora e de pessoa de grande caráter.

Ao Doutor John McGrath, com quem tive a honra de conviver e aprender muito sobre pesquisa e ética.

Ao professor Doutor Lucio Bakos, por sua imensa sabedoria que nos contagia e nos incentiva a busca constante e incessante pelo conhecimento. Foi um enorme prazer ter a oportunidade de conviver com uma pessoa tão sábia e gentil.

Aos professores e aos preceptores do Serviço de Dermatologia do HCPA, Luiz Fernando Bopp Muller, Isabel Kuhl, Márcia Zampese, Mirian Pargendler, Ane Maria Simões Pires e Marlene Weissbluth, por tudo que me ensinaram sobre Dermatologia e sobre a vida.

Ao professor e ao amigo André Cartell, por toda dedicação e ensinamentos em patologia dermatológica.

A equipe da Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que gentilmente me auxiliou na etapa de coleta e extração do material genético dos pacientes envolvidos no projeto.

Este projeto também não teria sido possível sem o auxílio técnico dos colaboradores estrangeiros na realização e na interpretação dos exames laboratoriais.

A Trish Dopping-Hepenstal, a Catherine Jones, a Linda Ozoemena e especialmente a Lu Liu.

À Doutora Taciana Dal’Forno Dini, que gentilmente me introduziu à síndrome de Kindler que colaborou muito com o projeto, primeiramente atendendo os pacientes no ambulatório de forma tão especial e, finalmente, oportunizando que eu seguisse o acompanhamento dos pacientes que permitiu a realização do estudo clínico e molecular.

À enfermeira Dóris Menegon, cujo trabalho muito admiro, pelo apoio irrestrito e pela amizade.

Aos colegas de residência e amigos, Mauren Seidl, Letícia Schenato, Patrícia Salenave, Fernanda Freitag, Renato Bakos, Gislaine Ceccon, Cíntia Grundler e Sandro Duarte, pelo constante estímulo.

Às secretárias Bernadete Hahmeyer e Rosane Blanguer que sempre me dispensaram muita atenção e carinho durante esta trajetória.

Às auxiliares e às secretárias do Ambulatório de Dermatologia, que me acolheram com muito carinho: Marta Sombra, Sivônia Teixeira, Madalena Teixeira, Jaqueline Karkus, Claonice Pinto e Eliane Judeh.

Enfim, a todos os pacientes e seus familiares, que me ensinaram muito sobre a vida e, irrestritamente, colaboraram com este estudo.

"(...) Na verdade, não é outra coisa o que faço nestas minhas andanças a não ser persuadir a vós, jovens e velhos, de que não deveis cuidar só do corpo, nem exclusivamente das riquezas, e nem de qualquer outra coisa antes e mais fortemente que da alma, de modo que ela se aperfeiçoe sempre, pois não é do acúmulo de riquezas que nasce a virtude, mas do aperfeiçoamento da alma é que nascem as riquezas e tudo o que mais importa ao homem (...)."

Sócrates (Atenas, 470 aC-399aC)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>08</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1. Perspectiva Histórica da Síndrome de Kindler .....	15
2.2. Manifestações clínicas .....	18
2.3. Aspectos Estruturais das Alterações Cutâneas .....	19
2.4. Imunofluorescência .....	21
2.5. Patogênese Molecular .....	21
2.6. Diagnóstico Diferencial .....	23
2.7. Tratamento .....	25
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	
.	
<b>5. PACIENTES E</b>	
<b>MÉTODOS.....</b>	
<b>6 ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL – PORTUGUÊS .....</b>	<b>36</b>
<b>7. ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL – INGLÊS .....</b>	<b>56</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AD:** Autossômica dominante

**AR:** Autossômica recessiva

**BSA:** Albumina bovina

**CA:** Câncer

**CEC:** Carcinoma Espino Celular

**DNA:** *Desoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico

**EB:** Epidermólise Bolhosa

**OCT:** *Optimal Cutting Temperature* - *Tissueteck*

**PBS:** *Phosphate buffer solution* -tampão de fosfato

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**RTS:** Síndrome de Rothmund Thomson

**SK:** Síndrome de Kindler

**XP:** Xeroderma Pigmentoso

## LISTA DE QUADROS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1: Compilação dos relatos de casos entre 1954 e 2006.....	16
Quadro 2: Resumo das alterações estruturais na Síndrome de Kindler.....	20
Quadro 3: Resumo das semelhanças e diferenças entre as fotodermatoses congênitas.....	25

## TABELA DO ARTIGO CIENTÍFICO – PORTUGUÊS

Tabela 1. Resumo das características clínicas dos pacientes neste estudo.....	45
Tabela 2. Alelos de <i>KIND 1</i> ancestrais associados com mutações patogênicas recorrentes causadoras da síndrome de Kindler nas duas famílias brasileiras.....	49

## TABELA DO ARTIGO CIENTÍFICO – INGLÊS

<b>Table 1.</b> Haplotype analysis for single nucleotide polymorphisms in the <i>KIND1</i> gene associated with the mutation c.676insC. ....	64
--	----

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO – PORTUGUÊS

Figura 1. Heredograma das famílias com SK deste estudo.....	44
Figura 2. Características clínicas dos casos de SK neste estudo.....	45
Figura 3. Microscopia eletrônica mostrando reduplicação da lâmina densa .....	47
Figura 4. Imunofluorescência de pele afetada com anticorpos anti-membrana basal.....	47
Figura 5. A mutação 676 insC no exon 5 das famílias brasileiras .....	48

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO – INGLÊS

<b>Figure 1.</b> (A) Brazilian pedigree with Kindler syndrome. (B) Clinical features of Kindler syndrome in this Brazilian Family .....	62
<b>Figure 2.</b> (A) Sequencing of genomic DNA from affected individuals in Family 1 and Family 2 reveals homozygous insertion of a cytosine at position 676 in exon 5 of the <i>KIND1</i> gene, c.676insC (arrows). In control DNA, there are 7 instead of 8 cytosine nucleotides. (B) Sequencing of two single nucleotide polymorphisms within intron 4 of the <i>KIND1</i> gene (IVS4+8T/C and IVS4 +34C/T) reveals heterozygosity for both polymorphisms in individuals from Family 1 but nucleotide homozygosity in the one affected individual in Family 2.....	63

## RESUMO

*Introdução:* A Síndrome de Kindler é uma doença autossômica recessiva que se caracteriza por surgimento de bolhas acrais na infância que diminuem com o passar dos anos, fotossensibilidade, poiquilodermia persistente e progressiva e atrofia cutânea. Desde o primeiro relato, mais de 100 casos já foram descritos, mas a associação com Poiquilodermia Acroceratótica e Epidermólise Bolhosa tem freqüentemente dificultado o diagnóstico. Exames moleculares nunca foram realizados em paciente brasileiros com Síndrome de Kindler.

*Objetivos:* O objetivo deste estudo é a identificação de alterações genéticas e estruturais nos pacientes com Síndrome de Kindler do sul do Brasil. *Pacientes e métodos:* Este estudo é uma série de casos de sete pacientes acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. Os pacientes com SK foram examinados clinicamente e o registro foi realizado em um questionário estruturado. As amostras de pele e sangue foram coletadas após consentimento informado com a aprovação pelo comitê de ética.

*Resultados:* Os achados clínicos mais consistentes para o diagnóstico foram bolhas na infância, fotossensibilidade e poiquilodermia. A ocorrência de carcinomas de pele não melanomas em dois pacientes jovens sugere que a SK pode ser um fator de risco no desenvolvimento de malignidades cutâneas. Uma mutação no exon 5 foi identificada nas duas famílias distintas que após o heredograma mostraram ter parentes em comum que vieram da mesma região da Itália há três gerações. *Conclusões:* Estes achados são muito importantes para a descrição de uma síndrome tipicamente caracterizada e para incrementar a estratégia de

detecção. A elucidação das mutações existentes é igualmente importante para o desenvolvimento de novos tratamentos e manejos dos pacientes afetados.

**Palavras-chave:** bolha, citoesqueleto, genodermatose, fotossensibilidade, poikilodermi...

## SUMMARY

*Background:* Kindler syndrome (KS) is a rare autosomal recessive disease characterized by acral bullae in infancy that diminished with time, photosensitivity, persistent progressive poikiloderma and severe cutaneous atrophy. Since the first report more than 100 cases have already been described but the association with acrokeratotic poikiloderma and epidermolysis bullosa has often misled the diagnosis. The molecular study of Brazilian patients with Kindler syndrome was never performed.

*Objectives:* To assess the clinical features and the molecular basis of KS in patients from South Brazil and to examine molecular evidence for a mutation.

*Patients and methods:* This study is a series of seven patients attending to Hospital de Clínicas de Porto Alegre during the period of January 2004 to December 2005. The KS affected individuals were examined clinically and a structured recording sheet was completed. Blood and skin samples were collected after informed consent and with the Ethics committee approval.

*Results:* The most consistent clinical signs for a diagnosis were blisters in childhood, photosensitivity and poikiloderma. The occurrence of non-melanoma skin cancers in two of the affected individuals at a relatively young age suggests that patients with KS may be prone to cutaneous malignancy. A mutation in exon 5 was identified in the two distinct families that after family tree showed to have relatives in common that came from the same region in Italy more than three generations ago.

*Conclusions:* These findings are very important to report a rare but well characterized syndrome and to increment detection strategies. The elucidation of the existent mutations is

equally important in the developing of new treatments and in the management of the affected patients.

**Key words:** blister, cytoskeleton, genodermatosis, photosensitivity, poikiloderma.

## 1. INTRODUÇÃO

A SK é uma doença rara de herança autossômica recessiva que foi descrita em 1954 por Theresa Kindler. (Kindler 1954) Caracteriza-se por lesões bolhosas na infância, seguidas por fotossensibilidade e poiquilodermia progressiva. A microscopia eletrônica das áreas afetadas revela reduplicação da membrana basal e vários níveis de clivagem na junção dermo-epidérmica. As bases genéticas da SK foram recentemente elucidadas e envolvem mutações com perda de função em um novo gene, KIND1, codificador da proteína kindlin1. (Jobard et al 2003; Siegel et al 2003) Estudos de biologia celular, expressão gênica e imunofluorescência, demonstraram que a proteína kindlin1 é expressa principalmente nos queratinócitos basais e participa na adesão do citoesqueleto da actina, via contatos focais, à matriz extracelular. Logo, a Síndrome de Kindler é a primeira genodermatose causada por um defeito na ligação actina-matriz extracelular. (Siegel et al 2003; Ashton et al 2004).

Apesar da síndrome ser clínica e estruturalmente caracterizada, os achados não são patognomônicos, tornando o diagnóstico preciso muito difícil. A partir de um diagnóstico clínico, realizou-se a revisão de outros possíveis casos atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo sido identificados onze pacientes com diagnóstico clínico compatível com SK.

A diferenciação clínica e morfológica da Síndrome de Kindler de outras doenças raras pode ser difícil causando muita confusão no estabelecimento de um diagnóstico preciso. (Has et al 2004) O fenótipo da síndrome muda com a idade e pode lembrar diferentes genodermatoses em diferentes momentos durante a vida do paciente afetado. O diagnóstico

diferencial da síndrome é um aspecto crucial para o entendimento das manifestações clínicas e deve incluir: Poiquilodermia Congênita (Síndrome de Rothmund-Thomson), Poiquilodermia Acroqueratótica Hereditária (Síndrome de Weary), Poiquilodermia Esclerosante Hereditária, Xeroderma Pigmentoso, Disqueratose Congênita, Dermatopatia Pigmentosa Reticularis, Síndrome de Bloom, Doença de Fanconi, Síndrome de Mendes da Costa, Incontinência Pigmentar (Tipo Bloch- Sulzberger), Síndrome de Franceschetti-Jadassohn, Síndrome de Degos-Touraine e Epidermólise Bolhosa. (Maleville et al 1982; Forman et al 1989; Weary et al 1971) Mesmo após a realização de exame anátomo-patológico e imunofluorescência com anticorpos contra a membrana basal, o diagnóstico de SK é difícil.

Logo, a caracterização precisa das possíveis mutações é importante para incrementar as estratégias de detecção e fornecer um diagnóstico acurado para que as famílias possam receber manejo adequado. A elucidação das mutações existentes é igualmente importante para o desenvolvimento de novos tratamentos, incluindo a terapia gênica. (Krunic et al 1997; Lanschuetzer et al 2004)

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Perspectiva histórica da Síndrome de Kindler**

Em 1954, Theresa Kindler descreveu um quadro cutâneo atípico em uma garota de 14 anos. Desde o nascimento, a paciente apresentava formação de bolhas acrais e fotossensibilidade que regrediram com o tempo. A paciente evoluiu com poiquilodermia progressiva, inicialmente nas áreas fotoexpostas se estendendo depois às áreas não expostas, atrofia intensa e pele com aspecto papel de cigarro no dorso dos pés e mãos. A menina apresentava ainda gengiva edemaciada e hemorrágica, sinéquias entre o segundo e terceiro dedos dos pés e palmas e plantas hiperqueratóticas e fissuradas. A autora sugeria que seu caso poderia se tratar de superposição de epidermólise bolhosa com poiquilodermia congênita ou uma nova síndrome. (Kindler 1954)

Em 1971, Weary et al. relataram uma doença de herança autossômica dominante que afetava 10 membros de uma família com as principais manifestações descritas por Kindler anteriormente. Os pacientes de Weary também apresentavam eczema generalizado e pápulas ceratóticas nas extremidades. A síndrome foi denominada de poiquilodermia hereditária acroqueratótica. (Weary et al 1971) Desde então, alguns autores acreditavam que a Síndrome de Kindler consistia em uma moléstia distinta, enquanto outros pensavam se tratar de uma variante da síndrome de Weary, a denominando de Poiquilodermia Acroqueratótica Hereditária e Bolhosa de Weary-Kindler. Inclusive, foi sugerida a possibilidade de sobreposição das duas síndromes. (Bordas et al 1982; Kapasi et al 1993; Kronic et al 1997) Ambas as síndromes cursam com bolhas na infância, poiquilodermia progressiva e periodontoses. Entretanto elas possuem inúmeras características distintas. Enquanto a SK é



autossômica recessiva a Síndrome de Weary é autossômica dominante e ainda apresenta eczema generalizado e ausência de fotossensibilidade. (Bruyneel-Rapp et al 1996)

Mais de 350 genodermatoses já foram caracterizadas em nível molecular. Estes novos conhecimentos proporcionam informação mais detalhada para os pacientes, permitem a realização de diagnósticos com maior acurácia e auxiliam na melhora do aconselhamento genético. A Síndrome de Kindler (OMIM173650) é uma genodermatose extremamente rara de herança autossômica recessiva. As suas bases genéticas permaneceram um mistério por muitos anos, até que em 2003 dois grupos relataram a identificação de mutações em uma nova proteína, nomeada subsequente de Kindlin 1, codificada pelo gene KIND1. Até hoje já foram determinadas 25 diferentes mutações no KIND1 em 41 famílias de diferentes partes do mundo. Mais de 100 casos já foram descritos e estão listados no **quadro 1**, mas até a presente data, nenhuma família brasileira foi estudada. A identificação de mutações recorrentes é extremamente relevante na elaboração das estratégias de detecção em pacientes com síndrome de Kindler de diferentes nacionalidades.

**Quadro 1:** Compilação dos relatos de casos entre 1954 e 2006

	<b>Heranca</b>	<b>Nacionalidade</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>LM</b>	<b>EM</b>	<b>IMF</b>
Kindler,1954	AR/S	/	14	F	+	-	-
Salamon et al, 1966	AR+C	/	15	M	+	-	-
Pinol Aguade et al, 1978							
Alper et al, 1978	AR/S	/	50	M	+	-	-
Person and Perry, 1979		/	14	M	-	-	-
Bordas et al, 1982	AR/S	/	26	M	+	-	-
Maleville et al,1982		França	6	F	+	+	+
Verret et al, 1984	AR+C	França	20	M	+	+	-
Blanchet-Bardon et al, 1985	AR/S	Iugoslávia	6	M	+	+	-
Hacham-Zadeh and Grfunkel,1985	AR+C	Curdos	19	F	+	-	-
Forman et al, 1989	AR/S	Estados Unidos	11 4	M F	+	+	+
					-	-	-

Hovnanian et al.,1989	AR+C	/	13	M	+	+	-
Shimamoto et.al, 1989	/	/	/	/	-	-	-
Szczerba et al., 1994	/	/	/	/	-	-	-
Ban et al.,1996	AR+C	Japão	46	M	-	+	+
Bruyneel-Rapp et al., 1996	AR/S	Estados Unidos	13	M	+	-	-
Wiebe et al., 1996	AR/S	/	16	F	-	-	-
Haber and Hanna, 1996	AR/S	/	21	M	+	+	+
	AR/S	/	24	M	-	-	-
Patrizi et al., 1996	AR+C	/	6	F	+	+	-
Krunic et al.,1997	AR/S	/	15	M	+	-	-
Ricketts et al.,1997	AR+C	Paquistão	29	F	+	-	-
	AR+C	Paquistão	19	M	-	-	-
Shimizu et al., 1997	AR+C	Japão	38	F	-	+	+
	AR+C	Japão	46	M	-	+	+
Couwenberg et al., 1998	/	/	/	/	-	-	-
Senturk et al.,1999	AR/S	/	11	F	+	+	-
Wiebe and Larjava,1999	AR+C	Afeganistão	16	F	+	+	+
Suga et al.,2000	AR+C	Japão	25	F	+	+	+
Binder et al, 2002	AR+C	/	18	F	+	+	+
Al Aboud et al.,2002	AR+C	Arábia Saudita	21-30	1F	-	-	-
	AR+C		6-21	3M 2F 2M	-	-	-
Yasukawa et al.,2002	AR/S	Japão	18	M	-	+	+
Chimenos-Kustner et al., 2003	AR/S	/	51	F	+	+	+
Sharma et al., 2003	AR+C	Índia	21	M	+	-	-
		Índia	24	M	+	-	-
Ashton et.al, 2003	AR+C	/	/	M/F	+	+	+
Penagos et al., 2004	AR+C	Panamá	7-46	M/F	+	+	+
Thomson et al., 2006	AR+C	Paquistão	/	M/F	+	+	+
Has et al., 2006	AR	Itália	/	M/F	+	+	+

Quadro 1. Revisão dos relatos de casos entre 1954 e 2006 AR/S – autossômica recessiva ou esporádica; AR/C – autossômica recessiva com consangüinidade; LM microscopia ótica; EM microscopia eletrônica; IMF imunofluorescência; / desconhecido; M Masculino; F feminino

## 2.2. Manifestações Clínicas

A característica inicial da Síndrome de Kindler é indução traumática de bolhas na primeira infância e fotossensibilidade. A ausência de outras manifestações típicas nos primeiros anos de vida geralmente leva à dificuldade ou atraso na definição do diagnóstico. Com o passar dos anos ocorre uma diminuição, até parada completa, na formação de bolhas e da fotossensibilidade enquanto a poiquilodermia progride nas áreas fotoexpostas, associada à atrofia cutânea. A recorrência de bolhas acrais na quinta década de vida já foi descrita, contudo não é comum seu aparecimento na SK. (Ban et al 1996)

Anormalidades ungueais, sinéquias nos dedos dos pés e mãos, inflamação crônica da mucosa oral, dentição comprometida, ceratoses seborreicas, hiperkeratose nas palmas e plantas, bandas escleróticas e pseudoainhum são também observados. (Krunic et al 1997; Hacham-Zadeh et al 1985; Al et al 2002, Thomson et al 2006)

Existem manifestações sistêmicas da síndrome, especialmente o trato respiratório, urinário e gastrointestinal nos pacientes afetados. A ocorrência de estenoses na laringe, uretra, esôfago e ânus, ectrópio e fimose devem-se ao fato das mucosas também serem suscetíveis à formação de bolhas, resultando em fibrose cicatricial. (Forman et al 1989; Penagos et al 2004) A ocorrência de malformações esqueléticas e oculares foi recentemente descrita por Sharma et al. (Sharma et al 2003)

Como parte das complicações tardias da SK existe a hipótese da associação à predisposição para neoplasias malignas uma vez que a paciente descrita por Alper et al. desenvolveu carcinoma espinocelular no lábio inferior e carcinoma de bexiga e a paciente de Lotem et al. desenvolveu carcinoma espinocelular no palato. Também foram relatados casos que desenvolveram carcinoma espinocelular no polegar, osteoma no crânio e tumor de Wilms. (Alper et al 1978; Lotem et al 2001)

### 2.3. Aspectos Estruturais das Alterações Cutâneas

O nível de formação da bolha na Síndrome de Kindler não foi bem caracterizado estruturalmente uma vez que as bolhas cessam com o passar dos anos e, na maior parte das vezes, quando o paciente é atendido, já não as possui mais. Por esta razão existe muita variabilidade nos achados estruturais de diversos estudos conforme demonstra o **quadro 2**. A microscopia eletrônica é a técnica ultraestrutural mais útil para o diagnóstico de SK na infância, apesar de não ser patognomônica. Após os primeiros anos de vida, com o cessamento na ocorrência de bolhas o diagnóstico é mais difícil. Assim, o exame ultraestrutural é extremamente útil na tentativa de se fechar o diagnóstico.

Muitos estudos testaram diferentes marcadores da membrana basal com o objetivo de descobrir a proteína envolvida na síndrome de Kindler. O primeiro estudo completo de microscopia eletrônica realizado em pele afetada com SK foi realizado por Verret et al em 1982. Este estudo demonstrou espaços entre os melanócitos da derme papilar, proliferação da lâmina densa, derme papilar e clivagem dermo-epidérmica abaixo dos queratinócitos basais, com a lâmina densa no assoalho da bolha. (Verret et al 1982)

O segundo estudo que auxilia no entendimento ultraestrutural da síndrome foi realizado por Forman et al e Hovnanian et al em 1989. Os autores demonstraram atrofia epidérmica, retificação, vacúolos ao longo da junção dermo-epidérmica, incontinência pigmentar, reduplicação da membrana basal, acantólise focal entre e logo abaixo dos queratinócitos basais. Hemidesmossomos, desmossomos, tonofilamentos, filamentos de ancoragem e fibrilas de ancoragem não mostraram alteração. (Forman et al 1989; Hovnanian et al 1989) Muitos outros estudos documentaram características semelhantes aumentando a confiança no estudo ultraestrutural como ferramenta diagnóstica na Síndrome de Kindler. (Suga et al 2000; Wiebe et al 1999; Shimizu et al 1997; Prendiville et al 1990; Person

el al 1979; Blanchet-Bardon 1990; Senturk et al 1999; Haber et al 1996) As características mais consistentes na literatura são reduplicação da membrana basal e descontinuidade na junção dermo-epidérmica, um achado também encontrado em outra genodermatose chamada de lipoido proteinose. (Hamada et al 2002) A segunda característica ultraestrutural mais significativa na pele dos pacientes com Síndrome de Kindler é a presença de múltiplos planos de clivagem que parece ocorrer somente na SK. Na SK podem ocorrer múltiplas clivagens dentro da camada dos queratinócitos basais e/ou na lamina lúcida, presença de numerosos melanófagos, alteração do colágeno e das fibras elásticas na derme papilar, assim como reduplicação extensa da lamina densa. (Shimizu et al 1997; Patrizi et al 1996; Lanschuetzer et al 2004)

**Quadro 2:** Resumo das alterações estruturais na Síndrome de Kindler

	<b>Reduplicação da lâmina densa</b>	<b>Clivagem sob a lâmina densa</b>	<b>Clivagem nos queratinócitos basais</b>	<b>Clivagem na lâmina lúcida</b>	<b>Lise ao redor de fibroblastos e melanócitos</b>
Verret, 1984	+	+	-	-	+
Blanchet-Bardon, 1985	-	+	+	-	-
Forman, 1989	+	+	+	+	+
Hovnanian, 1989	-	+	+	+	+
Ban, 1996	-	+	-	+	-
Patrizi, 1996	+	-	+	+	-
Haber, 1996	+	-	+	-	-
Shimizu, 1997	+	+	+	+	+
Senturk, 1999	-	+	+	+	-
Wiebe, 1999 (oral)	-	-	-	+	-
Suga, 2000	+	+	-	+	-
Binder, 2002	+	+	-	-	+
Yasukawa, 2002	+	+	-	+	-
Chimenos Kustner, 2003	+	-	-	-	-

## 2.4. Imunofluorescência

Por muito tempo, devido à coloração anormal do colágeno VII na derme dos pacientes com SK e densa reduplicação da lâmina densa, o diagnóstico da síndrome foi confundido com Epidermólise Bolhosa Distrófica nos estudos de imunofluorescência. No entanto o gene do colágeno VII, COL7A1 foi excluído como candidato para SK em 1997. (Shimizu et al 1997) Recentemente a proteína envolvida na síndrome de Kindler foi elucidada e foi desenvolvido um anticorpo específico para marcação dessa proteína, o antikindlin-1 que aparece nos cortes controles e está ausente na pele afetada com SK. A imunofluorescência com este novo anticorpo representa um teste diagnóstico novo e útil na abordagem dos casos suspeitos de Síndrome de Kindler. (Ashton et al 2004)

Com a identificação da Kindlin1 como a proteína alvo na SK, tornou-se possível à realização da técnica de imunofluorescência, específica e discriminatória, utilizando o anticorpo anti-kindlin1. A imunofluorescência da pele normal (controle) revela uma coloração brilhante na epiderme, especialmente nos queratinócitos basais e ao longo da junção dermo-epidérmica. Em contraste, na pele com Síndrome de Kindler, há uma redução acentuada, e em alguns casos ausência completa, da coloração. (Siegel et al 2003)

## 2.5. Patogênese Molecular

A Síndrome de Kindler é a primeira moléstia de fragilidade cutânea a ser causada por mutações numa proteína envolvida no complexo de ligação do citoesqueleto da actina com a matriz extracelular. (Ashton et al 2004) A estrutura e a distribuição da Kindlin1 dentro

dos queratinócitos sugerem um papel na adesão celular, mas também envolvimento na sinalização celular, morfogênese, migração e diferenciação celular. (Siegel et al 2003)

Na tentativa de identificar o gene da Síndrome de Kindler, foram coletadas amostras de DNA e realizada a análise genômica de grandes famílias consanguíneas de diversas localizações geográficas. Jobard et al. identificaram, através de mapeamento homozigótico, o locus da doença como a região de 834 Kb entre os marcadores D20S905 e D20S192 no cromossomo 20p12.3 em pacientes do norte da África, descendentes de Senegaleses e Argelinos. (Jobard et al 2003) Este locus foi confirmado e posteriormente refinado por Siegel et al para uma região de 280 Kb em pacientes do Panamá, Estados Unidos, Itália, Oman, Jordânia, Arábia Saudita, Afeganistão, Paquistão e Japão. (Siegel et al 2003) O intervalo crítico de 280 Kb contém seis diferentes genes, mas as mutações que envolviam perda de função foram encontradas por ambos os grupos no gene FLJ20116, renomeado de KIND1. Este gene ocupa 48.5Kb do genoma humano, tem sua expressão aumentada nos queratinócitos, cólon, rim e placenta e codifica uma proteína de 677 aminoácidos com um peso molecular de 77,3kDa. (Siegel et al 2003; Jobard et al 2003) Até a presente data já foram identificadas 25 mutações de perda de função em pacientes com Síndrome de Kindler, todas elas envolvidas em ablação ou grande redução na expressão da proteína Kindlin1. (Ashton 2004; Ashton et al 2004) As bases da fotossensibilidade, da poiquilodermia e do risco aumentado para malignidades mucocutâneas aguardam elucidação. Estudos de interação protéica e experimentos em biologia celular devem auxiliar na resolução destas questões. (McGrath 2004)

## 2.6. Diagnóstico Diferencial

A diferenciação clínica e morfológica da Síndrome de Kindler de outras doenças raras pode ser difícil causando muita confusão no estabelecimento de um diagnóstico preciso. (Has et al 2004) Como o fenótipo da síndrome muda com a idade, lembra diferentes genodermatoses, em diferentes momentos durante a vida do paciente afetado. Quando a pele torna-se poiquilodérmica e atrófica, emerge um fenótipo muito semelhante ao da poiquilodermia congênita associada à fotossensibilidade. O diagnóstico diferencial da síndrome é um aspecto crucial para o entendimento das manifestações clínicas e deve ser considerado quando se realiza o exame estrutural por Microscopia Eletrônica e Imunofluorescência na pele afetada. A dermatose mais frequentemente confundida com Síndrome de Kindler é a Epidermólise Bolhosa Distrófica, por causa das semelhanças clínicas como o surgimento de bolhas acrais induzidas por trauma na infância seguidas por atrofia cutânea, sinéquias, distrofia ungueal, estenoses uretrais e do trato gastrointestinal. Mesmo após a imunofluorescência com anticorpos contra a membrana basal, o diagnóstico de síndrome de Kindler é difícil. Entretanto características clínicas que diferenciam EB de SK incluem a diminuição no surgimento de bolhas que é substituída por poiquilodermia progressiva e persistente na Síndrome de Kindler, enquanto os pacientes com Epidermólise Bolhosa permanecem com fragilidade cutânea por toda a sua vida e usualmente não desenvolvem alterações pigmentares extensas. As duas síndromes estão associadas com taxa aumentada de câncer cutâneo (CA) , mas os riscos de carcinoma espinho celular (CEC) são maiores na Epidermólise Bolhosa Distrófica. (Malipeddi 2002) Na análise por microscopia eletrônica a maior semelhança entre as síndromes é o plano de clivagem abaixo da lâmina densa. Na epidermólise bolhosa há defeito nas fibrilas de ancoragem e uma importante redução ou até mesmo ausência dessas estruturas que podem ser evidenciadas em magnificação alta.



(Christiano et al 1996) Em contrapartida, na síndrome de Kindler encontram-se características únicas como os planos de clivagem alternativos, entre os queratinócitos basais, dentro da lâmina lúcida, reduplicação vasta da lâmina densa na derme e lise na matriz do colágeno extracelular na derme principalmente ao redor dos fibroblastos e melanócitos. Na ausência de um teste diagnóstico definitivo para SK, muitas vezes se relacionam outras condições que cursam com poiquilodermia congênita e fotodermatoses por causa das semelhanças clínicas. As manifestações clínicas vistas na SK, Rothmund Thompson, síndrome de Bloom e Werner que causam problemas na definição de um único diagnóstico incluem fotossensibilidade, poiquilodermia e telangiectasias. Entretanto outros achados divergem do quadro clínico da SK. Logo, na busca de diagnósticos diferenciais se deve incluir as seguintes condições: Poiquilodermia Congênita (Síndrome de Rothmund-Thomson), Poiquilodermia Acroqueratótica Hereditária (Síndrome de Weary), Poiquilodermia Esclerosante Hereditária, Xeroderma Pigmentoso, Disqueratose Congênita, Dermatopatia Pigmentosa Reticularis, Síndrome de Bloom, Doença de Fanconi, Síndrome de Mendes da Costa, Incontinência Pigmentar (Tipo Bloch-Sulzberger), Síndrome de Franceschetti-Jadassohn, Síndrome de Degos-Touraine e Epidermólise Bolhosa.(Weary et al 1971;Maleville et al 1982; Forman et al 1989)

O **quadro 3** resume as semelhanças e as diferenças entre as fotodermatoses congênicas.

O diagnóstico da Síndrome é clínico, mas avanços na investigação laboratorial descritos previamente auxiliam na caracterização precisa da Síndrome aumentando a acurácia do diagnóstico.

**Quadro 3:** Resumo das semelhanças e diferenças entre as fotodermatoses congêntas

	<b>SK</b>	<b>Weary</b>	<b>RTS</b>	<b>Bloom</b>	<b>XP</b>
Herança	AR	AD	AR	AR	AR
Bolhas acrais	++	+	+	-	-
Eritema/fotosensibilidade	++	-	+	++	++
Poiquilodermia	++	++	++	++	++
Telangiectasias	+	-	++	++	++
Atrofia cutânea	++	-	+	-	++
Anormalidades na mucosa	+	-	-	-	-
Envolvimentos dos anexos	+	-	++	-	-
Queratose palmo-plantar	+	++	-	-	-
Eczema	-	++	-	-	-
Estenose	+	-	-	-	-
Risco para CA	Cutâneo	-	Cutâneo	Vários	Cutâneo
Outras	Sinéquias Ectrópio Fimose		Catarata Hipogonadismo Defeitos ósseos	Nanismo Infertilidade QI baixo Imunodeficiência	Distúrbios neurológicos e oftalmológicos

Legenda: SK – Síndrome de Kindler; Weary – Poiquilodermia Acroqueratótica Hereditária; RTS- Síndrome de Rothmund Thomsom; Bloom – Síndrome de Bloom; XP- Xeroderma Pigmentoso.

## 2.7. Tratamento

O tratamento da Síndrome de Kindler é basicamente sintomático e preventivo. O uso de emolientes e foto protetores é de grande importância. Igualmente necessários são os antibióticos administrados conscienciosamente para o controle das infecções secundárias. A fisioterapia pode auxiliar na prevenção das limitações articulares e psicoterapia pode ser necessária devido ao prejuízo cosmético. Intervenções cirúrgicas, para correção de restrições, podem ser necessárias assim como a utilização de próteses dentárias devido a perda precoce dos dentes (Forman et al 1989; Al et al 2002; Binder et al 2002; Ad-El et al 2003) A evolução do conhecimento e a busca por causas específicas da Síndrome de Kindler

proporcionam um ponto de partida para o desenvolvimento de novos tratamentos, incluindo a terapia gênica.

### **3. JUSTIFICATIVA**

As bases genéticas da síndrome de Kindler permaneceram desconhecidas até que em 2003 dois grupos relataram a identificação de mutações em uma nova proteína. Estes novos conhecimentos proporcionam informação mais detalhada para os pacientes, permitem a realização de diagnósticos com maior acurácia e auxiliam na melhora do aconselhamento genético. Já foram determinadas 25 diferentes mutações nos genes em 41 famílias de diferentes partes do mundo, mas, nenhuma família brasileira foi estudada.

A caracterização precisa das possíveis mutações é importante para incrementar as estratégias de detecção e fornecer um diagnóstico acurado para que as famílias possam receber manejo adequado. A elucidação das mutações existentes é igualmente importante para o desenvolvimento de novos tratamentos, incluindo a terapia gênica. (Krunic et al 1997; Lanschuetzer et al 2004)

## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral:**

Estudar e identificar as alterações genéticas e estruturais em pacientes com diagnóstico de Síndrome de Kindler atendidos ou identificados no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Objetivos Específicos:**

1. Estabelecer heredograma dos casos afetados.
2. Realizar um registro acurado dos fenótipos clínicos e complicações.
3. Estudar e descrever as alterações estruturais das amostras.
4. Estudar as amostras utilizando técnica imunofluorescência para proteínas da membrana basal.
5. Identificar mutações que possam estar relacionadas com a Síndrome de Kindler.

## **5. PACIENTES E MÉTODOS**

### **Delineamento:**

Série de casos.

### **Pacientes:**

Pacientes com diagnóstico de Síndrome de Kindler avaliados pela equipe do Serviço de Dermatologia (casos avaliados no Ambulatório de Dermatologia, nas consultorias dermatológicas e registrados nas internações) de janeiro de 2004 até dezembro de 2005.

### **Critérios de Inclusão:**

Pacientes com diagnóstico clínico de Síndrome de Kindler identificados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre até o ano de 2005 que concordaram em participar do estudo.

### **Critérios de Exclusão:**

Pacientes que, por qualquer razão, não concordaram em participar do estudo.

### **Considerações Éticas:**

1. O projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: o paciente foi detalhadamente informado do curso, objetivo e intervenções da pesquisa. Após, foi oferecida a oportunidade de participar do estudo e solicitada a validação deste aceite através de assinatura em um termo de consentimento livre e esclarecido tanto para a realização do exame dermatológico, coleta

de sangue e biópsias, quanto para a documentação fotográfica das lesões dermatológicas (**anexo 2**).

### **Logística:**

Após o diagnóstico clínico de Síndrome de Kindler, o paciente e seus familiares foram convidados a participar deste estudo. Com a validação do termo de consentimento informado, foi realizado o primeiro exame dermatológico completo e os dados registrados em ficha clínica individual conforme o modelo do Anexo 1

### **Exame clínico:**

O exame dermatológico completo foi realizado por uma única examinadora (Dra. Beatriz Castellar de Faria Martignago) e sob orientação (Dra. Tania Cestari e Dr. John McGrath) com registro em ficha clínica individual conforme o modelo do anexo 1.

As lesões foram fotografadas com máquina digital, mantendo-se o registro em arquivo individualizado pelo nome do paciente, data da fotografia e com descrição dermatológica detalhada.

### **Extração do DNA:**

Foi retirado 10 ml por paciente, colocado em tubo com EDTA e o DNA foi extraído por técnica de *salting out* descrita previamente por Nasiri H et al emm 205 e resumida abaixo. (Nasiri et al 2005)

- Plaquetas e leucócitos nucleados foram obtidos após centrifugação do sangue anticoagulado em EDTA e recolocados em suspensão em 15 ml de polipropileno, adicionando-se 3 ml de tampão para lise ( 10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 8,2).

- O lisado de células foi digerido durante noite a 37° Celsius com 0,2 ml de lauril sulfato de sódio a 10% e 0,5 ml de protease K (1 mg de protease K em lauril sulfato de sódio a 1% e 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA).

- Após a digestão estar completa foi adicionado 1 ml de NaCl saturado (aproximadamente 6 M) e sacudido vigorosamente por 15 segundos, seguido de uma centrifugação de 2500 rpm por 15 minutos.

- As proteínas precipitadas são deixadas na parte inferior do tubo e o sobrenadante contendo o DNA é transferido para outro tubo com 15 ml de polipropileno.

- Foi adicionado 2 volumes de etanol 100% em temperatura ambiente e o tubo foi invertido diversas vezes até o DNA precipitar.

- O DNA precipitado foi removido com uma pipeta de plástico e transferido para um tubo que contém tampão (10mM Tris-HCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH7,5). O DNA permaneceu na solução por 2 horas em temperatura ambiente para se dissolver e foi armazenado a 4 ° Celsius.

### **Detecção da Mutação:**

Após a extração, o DNA foi enviado para o St John's Institute of Dermatology, Genetic Skin Research Group, St Thomas' Hospital, Londres, Inglaterra onde foi realizado o seqüenciamento para análise genética em busca de mutações, conforme os seguintes passos principais:

- O DNA extraído foi amplificado por PCR contendo 50 microlitros. As condições para amplificação foram 95° Celsius 5 minutos, seguidas de 35 ciclos de 95° Celsius por 45 segundos, 58° Celsius por 45 segundos e 72° Celsius por 45 segundos. Partes do produto do PCR foram examinadas em gel de agarose a 2%, utilizando análise hetroduplex para identificar exons que contivessem variação no seqüenciamento.

- A outra parte do PCR foi purificada utilizando o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen Ltd. Crawley, West Sussex, Reino Unido) previamente ao seqüenciamento de todos os 15 exons, que iniciava antes do início da codificação, para que mais tarde fosse realizada a análise dos haplótipos envolvidos nos genes e que pudéssemos acessar os diferentes polimorfismos. O seqüenciamento foi realizado pelo ABI 310 Genetic Analyser usando Big Dye v3.0 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire).

- Pares de *primers* intrônicos foram utilizados para cobrir todos os exons para rastreamento de mutações no material genético dos nossos pacientes. Cada *primer* foi desenvolvido para começar nos 50 pares de base intrônicos antes do início da codificação proteica(exon), para permitir ampliações das seqüências doadoras e receptoras. *Primers* do DNA podem ser visualizados no **anexo 3**.

### **Microscopia ótica:**

A microscopia ótica foi realizada no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de acordo com a rotina e avaliado pelo Professor André Cartell

### **Microscopia eletrônica:**

Para a microscopia eletrônica, o fragmento de pele foi retirado do fixativo e lavado três vezes com tampão de fosfato (PBS) a 0,1 M, cada vez por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foi secundariamente fixado em tetróxido de ósmio a 1,3% por 2 horas antes da desidratação por 15 minutos em etanol a 50%, corado com acetato de uranil a 2% em etanol a 50% por 1 hora e desidratado em etanol em concentrações de 50%, 70%, 95% e três vezes a 100%, cada uma por 15 minutos. A pele foi então incubada duas vezes em óxido de propileno por 15 minutos e transferida para solução 1:1:óxido de propileno:resina por 1 hora, recolocada em solução 1:3 óxido de propileno:resina e deixada sem cobertura até a evaporação



do etanol. A solução de óxido de propileno:resina foi então substituída por moldes com resina fresca, etiquetada e polimerizada por 60° Celsius por 16 horas. As seções de 60-90 nanômetros foram cortadas por um ultramicrotomo e visualizadas por um microscópio eletrônico (JEOL TEM 100CX). A interpretação da imagem foi realizada pela equipe treinada do laboratório em busca de alterações estruturais da membrana basal da pele.

### **Imunofluorescência:**

A amostra reservada para imunofluorescência foi fixada em meio Michel (sulfato de amônio, maleimido de N-etil e sulfato de magnésio em solução tamponada de citrato), imediatamente após a retirada e mantida até o processamento. Nesta etapa a amostra foi retirada do meio de Michel, embebida em Tissuteck (OCT) e congelada em nitrogênio líquido. Secções de 5 micrometros de pele foram cortadas dos bloco de OCT em criostato (Bright Ltd.) e colocadas em lâminas de vidro, que também continham secções de pele-controle. Os cortes foram secos ao ar por 10 minutos e desenhados anéis ao seu redor dos cortes usando uma caneta preta para melhor delimitação. As secções foram então lavadas em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente para remover o OCT, incubadas em soro de cabra a 33% em PBS com 3mg/ml de albumina bovina (BSA) por 10 minutos a 37° C. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS com 3mg/ml BSA como segue: GB3 (anti laminina 5), 1 em 300; LH7:2 (anti colágeno tipo VII), 1 em 1000; Col94 (anti colágeno tipo IV), 1 em 500. As lâminas foram então incubadas nos vários anticorpos por 30 minutos a 37° C, em câmara úmida. Foi retirado o excesso da solução de anticorpos e enxaguados em PBS, seguidos de lavagem por 10 minutos em PBS fresco em temperatura ambiente. A seguir, o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo-FITC (Serotec) foi diluído em PBS com 3mg/ml BSA a 1: 300 e adicionado aos cortes. 30 minutos a 37° C em câmara úmida. Foi retirado o excesso do anticorpo, enxaguado em PBS, lavado por 10 minutos em PBS fresco,

em temperatura ambiente e no escuro, seguido de lavagem com água destilada por 5 minutos, também no escuro. Finalmente as lâminas foram escurridas, secas ao ar, montadas com lamínula e seladas com esmalte. A leitura das reações foi realizada com microscópio Nikon Optiphot. As reações positivas expressavam-se por cor verde fluorescente e o fundo preto.

## BIBLIOGRAFIA

- Ad-El DD, Neuman A, Eldad A. Syndactyly repair in Kindler syndrome. *Plast.Reconstr.Surg.* 2003; **111**: 504-5.
- Al AK, Al HK, Al AD. Kindler syndrome in a Saudi kindred. *Clin.Exp.Dermatol.* 2002; **27**: 673-6.
- Alper JC, Baden HP, Goldsmith LA. Kindler's syndrome. *Arch.Dermatol* 1978; **114**: 457.
- Ashton GH, McLean WH, South AP, Oyama N, Smith FJ, Al-Suwaid R *et al.* Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome. *J.Invest Dermatol.* 2004; **122**: 78-83.
- Ashton GH. Kindler syndrome. *Clin.Exp.Dermatol.* 2004; **29**: 116-21.
- Ban M, Hosoe H, Yamada T, Nakatani A, Satoh M, Shimizu H *et al.* Kindler's syndrome with recurrence of bullae in the fifth decade. *Br.J.Dermatol* 1996; **135**: 503-4.
- Binder B, Metze D, Smolle J. [Congenital bullous poikiloderma (Kindler syndrome)]. *Hautarzt* 2002; **53**: 546-9.
- Blanchet-Bardon C, Paille M, Mimos C, Seon F, Dubertret L. [Theresa Kindler poikiloderma in the adult]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 1990; **117**: 787-9.
- Bordas X, Palou J, Capdevila JM, Mascaro JM. Kindler's syndrome. Report of a case. *J.Am.Acad.Dermatol* 1982; **6**: 263-5.
- Bruyneel-Rapp F, Mallory SB, Luke MC. What syndrome is this? Kindler syndrome. *Pediatr.Dermatol.* 1996; **13**: 427-9.
- Christiano AM, Uitto J. Molecular diagnosis of inherited skin diseases: the paradigm of dystrophic epidermolysis bullosa. *Adv.Dermatol* 1996; **11**: 199-213.

- Forman AB, Prendiville JS, Esterly NB, Hebert AA, Duvie M, Horiuchi Y *et al.* Kindler syndrome: report of two cases and review of the literature. *Pediatr.Dermatol.* 1989; **6**: 91-101.
  - Haber RM, Hanna WM. Kindler syndrome. Clinical and ultrastructural findings. *Arch.Dermatol.* 1996; **132**: 1487-90.
  - Hacham-Zadeh S, Garfunkel AA. Kindler syndrome in two related Kurdish families. *Am.J.Med.Genet.* 1985; **20**: 43-8.
  - Hamada T, McLean WH, Ramsay M, Ashton GH, Nanda A, Jenkins T *et al.* Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). *Hum.Mol.Genet.* 2002; **11**: 833-40.
  - Has C, Bruckner-Tuderman L. A novel nonsense mutation in Kindler syndrome. *J.Invest Dermatol.* 2004; **122**: 84-6.
  - Hovnanian A, Blanchet-Bardon C, de PY. Poikiloderma of Theresa Kindler: report of a case with ultrastructural study, and review of the literature. *Pediatr.Dermatol.* 1989; **6**: 82-90.
  - Jobard F, Bouadjar B, Caux F, Hadj-Rabia S, Has C, Matsuda F *et al.* Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**: 925-35.
  - Kapasi AY, Khopkar U, Raj S, Wadhwa SL. Weary-Kindler syndrome with multiple seborrheic keratoses. *Int.J.Dermatol.* 1993; **32**: 444-5.
  - Kindler, T. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br.J.Dermatol* 66, 104-111. 1954.
- Ref Type: Generic
- Kronic AL, Ljiljana M, Novak A, Carlos G, Clark RE. Hereditary bullous acrokeratotic poikiloderma of Weary-Kindler associated with pseudoainhum and sclerotic bands. *Int.J.Dermatol.* 1997; **36**: 529-33.

- Lanschuetzer CM, Muss WH, Emberger M, Phola-Gubo G, Klaisegger A, Bauer JW *et al.* Gene symbol: Kind1. Disease: kindler syndrome. *Hum.Genet.* 2004; **115**: 175.
- Lotem M, Raben M, Zeltser R, Landau M, Sela M, Wygoda M *et al.* Kindler syndrome complicated by squamous cell carcinoma of the hard palate: successful treatment with high-dose radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br.J.Dermatol.* 2001; **144**: 1284-6.
- Maleville J, Cavaroc Y, Boiron G, Tamisier JM, Surleve-Bazeill JE, Larregue M *et al.* [Diffuse poikiloderma with acrokeratosis, preceded by bullous lesions: Weary-Kindler's disease. Nosologic and histopathologic discussion]. *Ann.Dermatol Venereol.* 1982; **109**: 949-56.
- Mallipeddi R. Epidermolysis bullosa and cancer. *Clin.Exp.Dermatol* 2002; **27**: 616-23.
- McGrath JA. Translational benefits from research on rare genodermatoses. *Australas.J.Dermatol* 2004; **45**: 89-93.
- Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, Rahbarizadeh F. Salting out method: highyield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005; **19(6)**: 229-32
- Patrizi A, Pauluzzi P, Neri I, Trevisan G, De Giorgi LB, Pasquinelli G. Kindler syndrome: report of a case with ultrastructural study and review of the literature. *Pediatr.Dermatol.* 1996; **13**: 397-402.
- Penagos H, Jaen M, Sancho MT, Saborio MR, Fallas VG, Siegel DH *et al.* Kindler syndrome in native Americans from Panama: report of 26 cases. *Arch.Dermatol.* 2004; **140**: 939-44.
- Person JR, Perry HO. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation, anhidrosisi, and keratoderma. *Acta Derm.Venereol.* 1979; **59**: 347-51.

- Prendiville JS, Fine JD, Esterly NB. Kindler syndrome and epidermolysis bullosa simplex. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1990; **23**: 327-8.
- Senturk N, Usubutun A, Sahin S, Bukulmiz G, Erkek E, Topaloglu R *et al.* Kindler syndrome: absence of definite ultrastructural feature. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1999; **40**: 335-7.
- Sharma RC, Mahajan V, Sharma NL, Sharma AK. Kindler syndrome. *Int.J.Dermatol.* 2003; **42**: 727-32.
- Shimizu H, Sato M, Ban M, Kitajima Y, Ishuzaki S, Harada T *et al.* Immunohistochemical, ultrastructural, and molecular features of Kindler syndrome distinguish it from dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch.Dermatol.* 1997; **133**: 1111-7.
- Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC *et al.* Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 2003; **73**: 174-87.
- Suga Y, Tsuboi R, Hashimoto Y, Yaguchi H, Ogawa H. A Japanese case of Kindler syndrome. *Int.J.Dermatol.* 2000; **39**: 284-6.
- Thomson MA, Ashton GH, McGrath JA, Eady RAJ, Moss C. Retrospective diagnosis of Kindler syndrome in a 37-year-old man. *Clin.Exp.Dermatol.* 2006; **31**: 45-7.
- Verret JL, Avenel M, Larregue M, Panigel-Nguyen C. [Kindler syndrome. Case report with ultrastructure study]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 1984; **111**: 259-69.
- Weary PE, Manley WF, Jr., Graham GF. Hereditary acrokeratotic poikiloderma. *Arch.Dermatol* 1971; **103**: 409-22.
- Wiebe CB, Larjava HS. Abnormal deposition of type VII collagen in Kindler syndrome. *Arch.Dermatol.Res.* 1999; **291**: 6-13.

## 6. ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL – PORTUGUÊS

### **Caracterização Clínica e Molecular da Síndrome de Kindler em um heredograma brasileiro**

Autores: Beatriz Castellar de Faria Martignago<sup>1,\*</sup>, John McGrath<sup>2</sup>, Tania Ferreira Cestari<sup>1</sup>

Local: <sup>1</sup>Serviço de Dermatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil e <sup>2</sup>Genetic Skin Disease Group, St John's Institute of Dermatology, Division of Skin Sciences, The Guy's, King's College and St Thomas' Hospitals' Medical School, Londres, Inglaterra

\*Correspondência: Beatriz Castellar de Faria Martignago

Serviço de Dermatologia

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Largo Eduardo Zaccaro Faraco

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre, Brazil

Tel: (55) (48) 3433 0933

E-mail: [beatrizmartignago@gmail.com](mailto:beatrizmartignago@gmail.com)

**Resumo:**

A Síndrome de Kindler é uma doença autossômica recessiva que se caracteriza por surgimento de bolhas acrais na infância que diminuem com o passar dos anos, fotossensibilidade, poiquilodermia persistente e progressiva e atrofia cutânea. Desde o primeiro relato, mais de 100 casos já foram descritos, mas a associação com Poiquilodermia Acroceratótica e Epidermólise Bolhosa tem freqüentemente dificultado o diagnóstico. Exames moleculares nunca foram realizados em paciente brasileiros com Síndrome de Kindler. O objetivo deste estudo é a identificação de alterações genéticas e, estruturais nos pacientes com Síndrome de Kindler do sul do Brasil. Este estudo é uma série de casos de sete pacientes acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. O pacientes com SK foram examinados clinicamente e o registro foi realizado em um questionário estruturado. As amostras de pele e sangue foram coletadas após termo de consentimento livre e esclarecido com a aprovação pelo comitê de ética. Os achados clínicos mais consistentes para o diagnóstico foram bolhas na infância, fotossensibilidade e poiquilodermia. A ocorrência de carcinomas de pele não melanomas em dois pacientes jovens sugere que a SK pode ser um fator de risco no desenvolvimento de malignidades cutâneas. Uma mutação no exon 5 foi identificada nas duas famílias distintas que após o heredograma mostraram ter parentes em comum que vieram da mesma região da Itália há três gerações. Estes achados são muito importantes para a descrição de uma síndrome tipicamente caracterizada e para incrementar a estratégia de detecção. A elucidação das mutações existentes é igualmente importante para o desenvolvimento de novos tratamentos e manejos dos pacientes afetados.

**Palavras-chaves:** bolha, citoesqueleto, genodermatose, fotossensibilidade, poiquilodermia.



## Summary

*Background:* Kindler syndrome (KS) is a rare autosomal recessive disease characterized by acral bullae in infancy that diminished with time, photosensitivity, persistent progressive poikiloderma and severe cutaneous atrophy. Since the first report more than 100 cases have already been described but the association with acrokeratotic poikiloderma and epidermolysis bullosa has often misled the diagnosis. The molecular study of Brazilian patients with Kindler syndrome was never performed.

*Objectives:* To assess the clinical features and the molecular basis of KS in patients from South Brazil and to examine molecular evidence for a mutation.

*Patients and methods:* This study is a series of seven patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The KS affected individuals were examined clinically and a structured recording sheet was completed. Samples were collected after informed consent and with Ethics committee approval.

*Results:* The most consistent clinical signs for a diagnosis was blisters in childhood, photosensitivity and poikiloderma. A mutation in exon 5 was identified in the two distinct families that after family tree showed to have relatives in common that came from the same region in Italy more than three generations ago.

*Conclusions:* These findings are very important to report a rare but well characterized syndrome and to increment detection strategies. The elucidation of the existent mutations is equally important in the developing of new treatments and in the management of the affected patients.

*Key words:* blister, cytoskeleton, genodermatosis, photosensitivity, poikiloderma

## Introdução

Theresa Kindler descreveu em 1954 uma dermatose incomum em uma menina de 14 anos que apresentava bolhas acrais desde o nascimento e fotossensibilidade que diminuíram na puberdade. A paciente permaneceu com poiquilodermia progressiva, atrofia cutânea intensa, gengivite, sinéquias e hiperqueratose palmo-plantar. A autora sugeriu que o caso pudesse se tratar de uma forma de epidermólise bolhosa ou de uma nova síndrome.<sup>1</sup>

A síndrome de Kindler (OMIM173650) é uma genodermatose extremamente rara e suas bases genéticas permaneceram um mistério por muitos anos até que em 2003, dois grupos diferentes relataram a identificação de mutações em uma nova proteína responsável pela doença. O gene acometido foi nomeado de Kind 1 e localizado no cromossomo 20p12.3 ocupando 48.5 Kb do genoma humano. Tem sua expressão acentuada nos queratinócitos, cólon, rim e placenta. Codifica uma proteína com 677 aminoácidos de peso molecular de 77.3 kDa chamada Kindlin 1.<sup>2;3</sup> Todas as mutações identificadas causam perda de função do KIND 1, representando a importância da proteína kindlin 1 na manutenção da adesão celular.<sup>4</sup> A SK é a primeira genodermatose causada por defeitos estruturais entre o citoesqueleto da actina, contatos focais e a matriz extracelular.<sup>5</sup> Com o objetivo de identificar as possíveis mutações, uma grande série de pacientes foi investigada e as principais características clínicas foram fragilidade cutânea, fotossensibilidade, atrofia cutânea, poiquilodermia, hiperqueratose palmo-plantar, manifestações na mucosa incluindo mucosite hemorrágica, gengivite hemorrágica, doença periodontal, perda precoce de dentes, leucoqueratose labial, estenose uretral, ectrópio e fimose.<sup>6</sup> A diferenciação clínica e morfológica entre a Síndrome de Kindler e outras genodermatoses pode ser muito difícil.<sup>7-12</sup> Famílias de diferentes partes do mundo foram estudadas com o objetivo de realizar um diagnóstico preciso, identificar outras possíveis mutações para incrementar as estratégias de detecção e buscar alternativas terapêuticas.<sup>13</sup> Estas são as primeiras famílias brasileiras a serem estudadas clínica e

molecularmente até a presente data. O objetivo deste estudo foi caracterizar clinicamente e molecularmente uma amostra de pacientes do sul do Brasil com diagnóstico clínico de Síndrome de Kindler.

## **Método**

*Delineamento:* Série de casos

*Pacientes:* pacientes com diagnóstico de Síndrome de Kindler avaliados pela equipe do Serviço de Dermatologia (casos avaliados no Ambulatório de Dermatologia, nas consultorias dermatológicas e registrados nas internações) de janeiro de 2004 até dezembro de 2005.

*Considerações éticas:* O estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes e familiares foram esclarecidos quanto ao estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi validado através da assinatura do paciente ou seu responsável legal.

### **Exame clínico:**

O exame dermatológico completo foi realizado por uma única examinadora (Dra. Beatriz Castellar de Faria Martignago) e sob orientação (Dra. Tania Cestari e Dr. John McGrath) .Foi coletada a história e realizado o exame físico completo em todos os sete pacientes com SK (4 mulheres e 3 homens entre 17 e 51 anos) de 2 diferentes famílias utilizando um formulário de registro estruturado.

As lesões foram fotografadas com máquina digital, mantendo-se o registro em arquivo individualizado pelo nome do paciente, data da fotografia e com descrição dermatológica detalhada.

**Extração do DNA:**

1. O sangue foi coletado pela examinadora de duas pacientes afetadas da família 1 e uma paciente afetada da família 2. Foi retirado 10 ml por paciente em EDTA e o DNA foi extraído por técnica de *salting out* descrita abaixo.<sup>14</sup>

- Plaquetas e leucócitos nucleados foram obtidos após centrifugação do sangue anticoagulado em EDTA e recolocados em suspensão em 15 ml de polipropileno, adicionando-se 3 ml de buffer para lise ( 10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2).

- O lisado de células foi digerido durante noite a 37° Celsius com 0,2 ml de lauril sulfato de sódio a 10% e 0,5 ml de protease K (1 mg de protease K em lauril sulfato de sódio a 1% e 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA).

- Após a digestão estar completa foi adicionado 1 ml de NaCl saturado (aproximadamente 6 M) e sacudido vigorosamente por 15 segundos, seguido de uma centrifugação de 2500 rpm por 15 minutos.

- As proteínas precipitadas são deixadas na parte inferior do tubo e o sobrenadante contendo o DNA é transferido para outro tubo com 15 ml de polipropileno.

- Foi adicionado 2 volumes de etanol 100% em temperatura ambiente e o tubo foi invertido diversas vezes até o DNA precipitar.

- O DNA precipitado foi removido com uma pipeta de plástico e transferido para um tubo que contém tampão (10mM Tris-HCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH7,5). O DNA permaneceu na solução por 2 horas em temperatura ambiente para se dissolver e foi armazenado a 4 ° Celsius.

### **Detecção da Mutação:**

Após a extração, o DNA foi enviado para o St John's Institute of Dermatology, Genetic Skin Research Group, St Thomas' Hospital, Londres, Inglaterra onde foi realizado o seqüenciamento para análise genética em busca de mutações, conforme os seguintes passos principais:

- O DNA extraído foi amplificado por PCR contendo 50 microlitros. As condições para amplificação foram 95° Celsius 5 minutos, seguidas de 35 ciclos de 95° Celsius por 45 segundos, 58° Celsius por 45 segundos e 72° Celsius por 45 segundos. Partes do produto do PCR foram examinadas em gel de agarose a 2%, utilizando análise hetroduplex para identificar exons que contivessem variação no seqüenciamento.

- A outra parte do PCR foi purificada utilizando o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen Ltd. Crawley, West Sussex, Reino Unido) previamente ao seqüenciamento de todos os 15 exons, que iniciava antes do início da codificação, para que mais tarde fosse realizada a análise dos haplótipos envolvidos nos genes e que pudéssemos acessar os diferentes polimorfismos. O seqüenciamento foi realizado pelo ABI 310 Genetic Analyser usando Big Dye v3.0 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire).

- Pares de *primers* intrônicos foram utilizados para cobrir todos os exons para rastreamento de mutações no material genético dos nossos pacientes. Cada *primer* foi desenvolvido para começar nos 50 pares de base intrônicos antes do início da codificação proteica(exon), para permitir amplificações das seqüências doadoras e receptoras.

### **Microscopia ótica:**

A microscopia ótica foi realizada no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de acordo com a rotina e avaliado pelo Professor André Cartell

**Microscopia eletrônica:**

A biópsia foi realizada em uma paciente afetada da família 1, por técnica de *shaving*. Metade da amostra foi fixada em glutaraldeído a 2,5% para microscopia eletrônica e metade em meio de Michel para Imunofluorescência. A biópsia foi retirada do fixativo e lavada três vezes com tampão de fosfato (PBS) a 0,1 M, cada vez por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foi secundariamente fixada em tetróxido de ósmio a 1,3% por 2 horas antes da desidratação por 15 minutos em etanol a 50%, corada com acetato de uranil a 2% em etanol a 50% por 1 hora e desidratada em etanol em concentrações de 50%, 70%, 95% e três vezes a 100%, cada uma por 15 minutos. A pele foi então incubada duas vezes em óxido de propileno por 15 minutos e transferida para solução 1:1:óxido de propileno:resina por 1 hora, recolocada em solução 1:3 óxido de propileno:resina e deixada sem cobertura até a evaporação do etanol. A solução de óxido de propileno:resina foi então substituída por moldes com resina fresca, etiquetada e polimerizada por 60° Celsius por 16 horas. As seções de 60-90 nanômetros foram cortadas por um ultramicrótomo e visualizadas por um microscópio eletrônico (JEOL TEM 100CX). A interpretação da imagem foi realizada pela equipe treinada do laboratório em busca de alterações estruturais da membrana basal da pele como a visualização da reduplicação da lâmina densa que é característico na SK

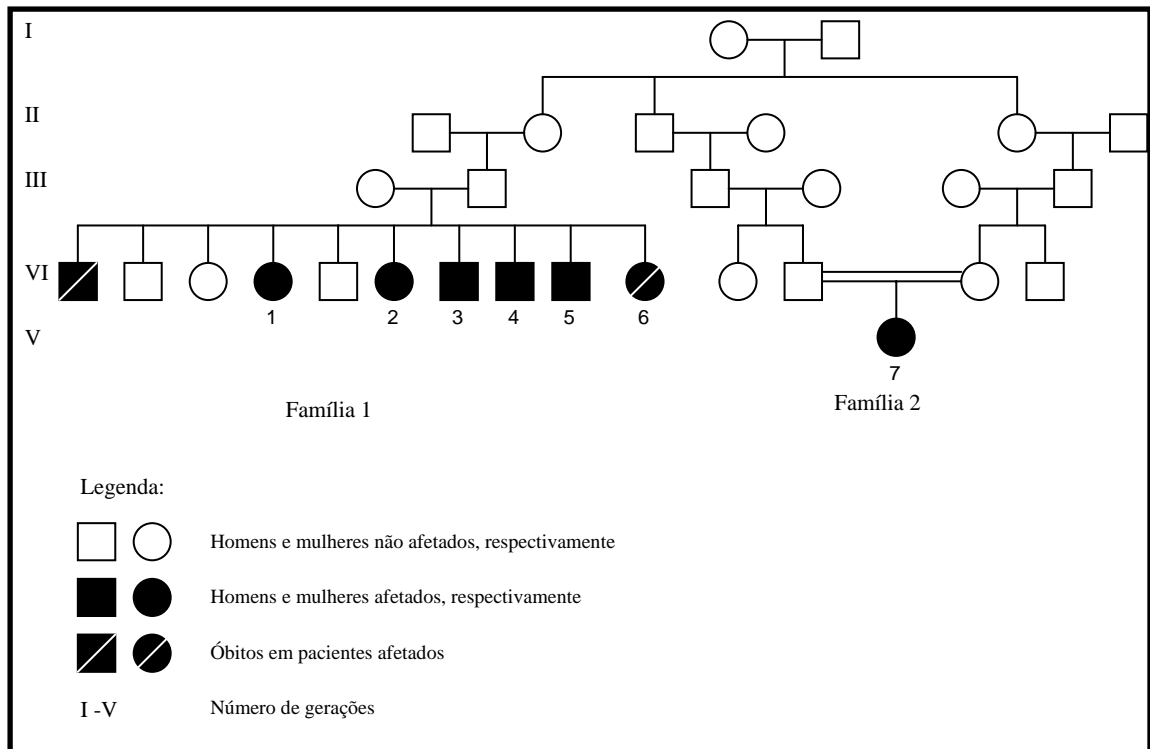
**Imunofluorescência:**

A amostra reservada para imunofluorescência foi fixada imediatamente após a retirada em meio Michel (sulfato de amônia, maleimido de N-etil e sulfato de magnésio em solução tamponada de citrato) até o processamento. Nesta etapa a amostra foi retirada do meio de Michel, embebida em Tissueteck (OCT) e congelada em nitrogênio líquido. Secções de 5 micrometros de pele foram cortadas dos bloco de OCT em criostato (Bright Ltd.) e colocadas em lâminas de vidro, que também continham secções de pele-controle. Os cortes foram secos

ao ar por 10 minutos e desenhados anéis ao seu redor dos cortes usando uma caneta preta para melhor delimitação. As secções foram então lavadas em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente para remover o OCT, incubadas em soro de cabra a 33% em PBS com 3mg/ml de albumina bovina (BSA) por 10 minutos a 37° C. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS com 3mg/ml BSA como segue: GB3 (anti laminina 5), 1 em 300; LH7:2 (anti colágeno tipo VII), 1 em 1000; Col94 (anti colágeno tipo IV), 1 em 500. As lâminas foram então incubadas nos vários anticorpos por 30 minutos a 37° C, em câmara úmida. Foi retirado o excesso da solução de anticorpos e enxaguados em PBS, seguidos de lavagem por 10 minutos em PBS fresco em temperatura ambiente. A seguir, o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo-FITC (Serotec) foi diluído em PBS com 3mg/ml BSA a 1: 300 e adicionado aos cortes. 30 minutos a 37° C em câmara úmida. Foi retirado o excesso do anticorpo, enxaguado em PBS, lavado por 10 minutos em PBS fresco, em temperatura ambiente e no escuro, seguido de lavagem com água destilada por 5 minutos, também no escuro. Finalmente as lâminas foram escurridas, secas ao ar, montadas com lamínula e seladas com esmalte. A leitura das reações foi realizada com microscópio Nikon Optiphot. As reações positivas expressavam-se por coloração verde fluorescente e fundo preto.

## **Resultados**

Foram estudados sete casos de Síndrome de Kindler em duas famílias do sul do Brasil que após a realização do heredograma ( **figura 1**) evidenciou-se que a família 2 é relacionada com o lado paterno da família 1. Há 3 gerações as 2 famílias vieram da região de Treviso na Itália e se estabeleceram em diferentes regiões do Rio Grande do Sul.



**Figura 1.** Heredograma das famílias com SK deste estudo

Foram revisados os fenótipos clínicos e características morfológicas de sete pacientes com Síndrome de Kindler de duas famílias. Como os pacientes possuem idades diferentes entre si, não foi possível registrar a seqüência dos eventos. Todos os pacientes possuem características clínicas similares a outras alterações de fragilidade cutânea e fotossensibilidade, incluindo bolhas induzidas por trauma na infância seguidas de fotossensibilidade e poiquilodermia progressiva e persistente resultando em alterações pigmentares, telangiectasias e atrofia. As características clínicas estão ilustradas **na figura 2.**





**Figura 2.** Características clínicas dos casos de SK neste estudo

Poiquilodermia evidente na face, pescoço e mãos e presença de ulceração no lábio inferior.

Aspectos adicionais se apresentaram em diferentes graus de gravidade e incluíram disfagia, constrição esofágica e genital, ectrópio, oncodistrofia, anormalidades da mucosa oral e da dentição, sinéquias dos dedos da mão e cânceres cutâneos conforme mostra a **tabela 1.**

**Tabela 1.** Resumo das características clínicas dos pacientes neste estudo

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Idade ( anos)	51	42	35	33	32	30	17
Sexo	F	F	M	M	M	F	F
Bolhas acrais na infância	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia cutânea	+	+	+	+	+	+	+
Poiquilodermia	+	+	+	+	+	+	+
Eczema	+	+	+	+	+	+	+
Hiperqueratose palmo-plantar	+	-	+	-	-	-	+

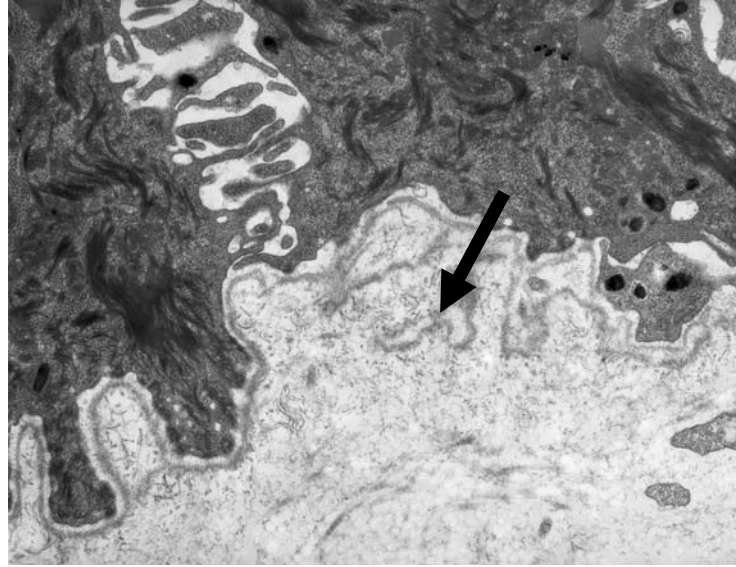
Fotossensibilidade	+	+	+	+	+	+	+
Envolvimento das mucosas	+	+	+	+	+	+	+
Manifestações ungueais	+	+	+	+	+	+	+
Sinéquias	+	+	+	+	+	+	+
Consanguinidade	-	-	-	-	-	-	+
Carcinomas cutâneos	+	+	-	-	-	-	-
Estenoses esofágicas	+	+	+	+	-	+	+
Ectrópio	+	+	+	+	+	-	-

O sangue foi obtido de três pacientes afetados, dois da família 1 e um indivíduo afetado da família 2. Três pacientes foram biopsiados mas somente uma biópsia foi submetida à microscopia eletrônica e imunofluorescência. Os estudos foram realizados no sentido de esclarecimento da análise genética e entendimento ultraestrutural da síndrome de Kindler.

O anátomo patológico que foi realizado em três pacientes afetados no serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob supervisão do Dr. André Cartell e todas mostraram características semelhantes. Os cortes mostraram *splits* e vacuolização focal em vários níveis próximos da junção dermo-epidérmica. Todos os casos mostraram retificação da junção dermo-epidérmica, ao contrário das ondulações usuais da pele normal. Outros achados incluem atrofia epidérmica e hiperqueratose.

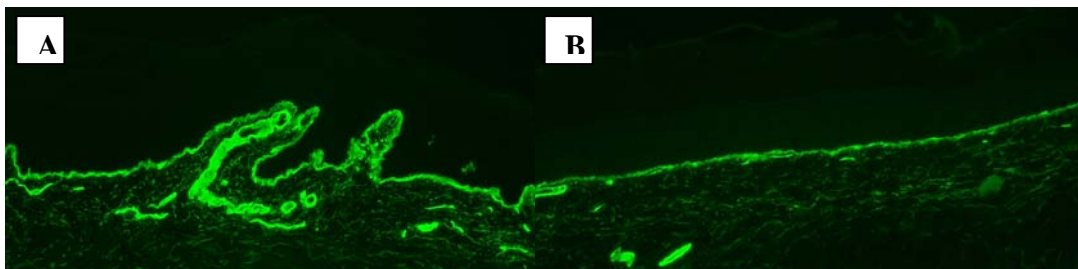
Em alguns casos foram encontradas abundância de fibroblastos na derme papilar e alteração na arquitetura das fibras colágenas.

As principais características vistas na microscopia eletrônica foram reduplicação da membrana basal na derme papilar demonstradas na **figura 3**.



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de pele afetada mostrando reduplicação da lâmina densa

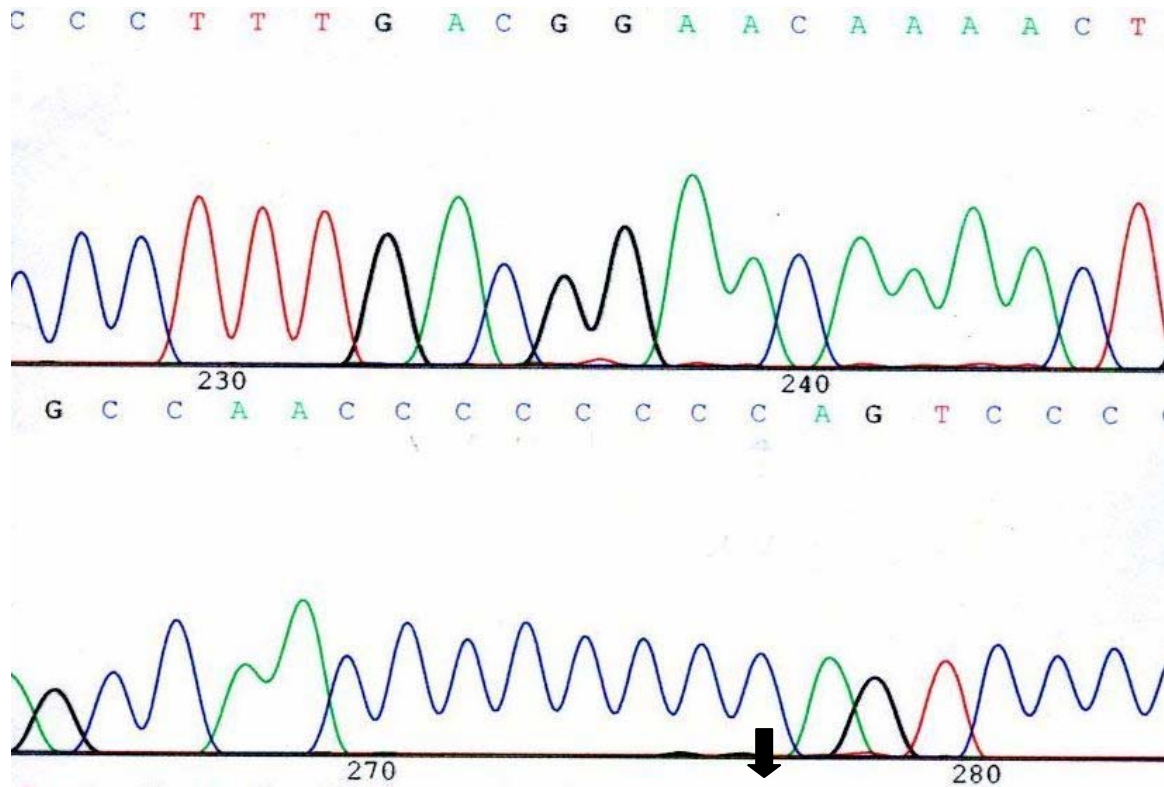
A imunofluorescência revelou positividade linear para os anticorpos contra proteínas hemidesmosômicas, laminina 5, plectina e colágeno XVII. Marcação para anticorpos contra colágeno VII e IV e ocasionalmente laminina 5, mostrou positividade na **figura 4.**



**Figura 4.** Imunofluorescência de pele afetada com anticorpos anti-membrana basal

Imunolocalização do colágeno tipo VII: A marcação normal da zona da membrana basal na pele controle; B ausência de alteração do padrão de marcação na pele afetada.(Magnificação de A e B, / 100)

Em todas as amostras analisadas nesse estudo o seqüenciamento revelou uma inserção homozigótica de uma citosina na posição 676 do exon 5 do KIND1, chamada de 676insC ilustrado na **figura 5**.



**Figura 5.** A mutação 676 insC no exon 5 das famílias brasileiras evidencia a inserção de uma oitava citosina, onde normalmente encontram-se somente 7.

O seqüenciamento do DNA genômico de pacientes afetados mostrou que o gene KIND1 contém muitos polimorfismos. Eles foram utilizados para criar haplótipos nos pacientes estudados.

### Discussão

Os resultados obtidos pela avaliação clínica e laboratorial dos pacientes apresentados neste estudo enfatizam a heterogeneidade clínica da Síndrome de Kindler e suas similaridades fenotípicas com outras genodermatoses, em particular com Epidermólise

Bolhosa e Síndrome de Weary. Conseqüentemente, o diagnóstico preciso é muito difícil, principalmente na infância onde a história e o exame físico são indistinguíveis de condições igualmente congênitas.<sup>15-18</sup>

O exame anátomo patológico da pele dos pacientes com Síndrome de Kindler quando realizado na primeira infância enquanto ocorre a formação de lesões bolhosas revela múltiplos planos de clivagem ao longo da junção dermo-epidérmica, hiperqueratose, atrofia epidérmica, retificação e incontinência pigmentar.<sup>19</sup> Fendas podem aparecer simultaneamente dentro dos queratinócitos basais, na junção dermo-epidérmica e na derme papilar, mas como vimos com os pacientes brasileiros estudados os achados resumiram-se a atrofia epidérmica, retificação e hiperqueratose. Reduplicação da zona membrana basal não foi observada. Nossos achados são compatíveis com outros casos descritos da SK, mas não tão ricos e muito menos patognomônicos. A microscopia eletrônica do paciente brasileiro avaliado mostrou reduplicação da lamina densa que se estendia até a derme papilar. A lâmina densa é produzida por queratinócitos basais para servir de camada de ancoragem entre a epiderme e a derme, os queratinócitos basais aderem via placas de hemidesmosomos.<sup>20</sup> Apesar de ter sido possível demonstrar que outros constituintes da junção dermo-epidérmica como hemidesmosomos ou mesmo as fibrilas de ancoragem estavam em número e aparência normais. Este achado mais uma vez ressaltando o fato de que os achados ultraestruturais na SK são sugestivos, mas não definitivos.

O exame de imunofluorescência não demonstrou patologia óbvia que envolvesse os colágenos tipo IV e VII . A lamina densa é o principal reservatório de colágeno tipo VII e também é uma fonte de colágeno tipo IV e laminina 5.<sup>21-24</sup> Entretanto o excesso de colágeno VII pode ser encontrado na Síndrome de Kindler e não deve ser entendido como causa da doença pois o gene do colágeno VII já foi excluído como candidato na Síndrome de Kindler por Shimizu em 1997 e Yasukawa em 2002.

Os achados de imunofluorescência e ultraestruturais sugerem que a patologia base da Síndrome de Kindler distingue dos vários tipos de Epidermólise bolhosa que já foram caracterizados em nível molecular.

A análise de haplótipos desses polimorfismos nos pacientes afetados demonstrou que a família 1 possui um ancestral em comum com a família 2 e quando comparadas com as famílias do Paquistão que também possuem a mesma mutação, demonstram não possuírem os mesmos ancestrais como mostra a **tabela 2.**<sup>25</sup>

**Tabela 2.** Alelos de KIND 1 ancestrais associados com mutações patogênicas recorrentes causadoras da síndrome de Kindler nas 2 famílias brasileiras,

KIND1 Polimorfismos	Exon	Mutação (676insC)				
		Paquistão 1	Paquistão 2	Brasil 1	Brasil 2	
IVS1-11T/G	2	G	G	G	G	G
114T/C	2	C	C	C	C	C
IVS2+20C/T	2	C	C	C	C	C
IVS2-4G/A	3	A	G	A	A	A
479T/C	4	T	C	T	T	T
IVS4+8T/C	4	C	T	T/C	T/C	T
IVS4+34C/T	4	T	C	C/T	C/T	C
IVS4-25A/	5	A	G	A	A	A
IVS4-17A/	5	A	C	A	A	A
IVS5-17A/C	6	C	T	A	A	A
772T/C	6	C	T	T	T	T
IVS6-50 T/	7	/	/	T	T	T
IVS7-46A/G	8	/	/	IVS7- 50-8	IVS7- 50-8	G
IVS8+48A/	8	/	/	A	A	A
1575G/A	12	G	/	A	A	A
1577A/G	12	A	/	G	G	G
1695T/C	13	T	C	T	T	T
IVS13+52C/T	13	/	/	C	C	C

Recentemente a síndrome de Kindler foi definida como entidade distinta e sua caracterização molecular foi descoberta.<sup>26</sup> Inúmeras famílias de diferentes partes do mundo

foram estudadas.<sup>27</sup> O objetivo deste estudo foi caracterizar clinicamente e molecularmente uma amostra de pacientes do sul do Brasil com diagnóstico clínico de Síndrome de Kindler.

A SK é causada por mutações no gene kind 1, previamente caracterizado e localizado no cromossomo 20p12.3, ocupa 45 kb do genoma humano, contém 15 exons e uma leitura de 2034 pares de bases. Este gene codifica uma proteína de 677 aminoácidos nomeada de kindlin 1 que tem sua expressão ausente ou diminuída nos pacientes com Síndrome de Kindler.

Até o presente momento mais de 25 mutações já foram encontradas<sup>28</sup> e os primeiros pacientes brasileiros estudados molecularmente e apresentados neste estudo possuem a mutação 676insC que foi previamente descrita em famílias paquistanesas

A síndrome de Kindler é a primeira genodermatose causada por defeitos na adesão do citoesqueleto da actina com a matriz extracelular se revelando clinicamente por fragilidade cutânea e análises de expressão gênica demonstram que a proteína envolvida é encontrada, em condições normais, principalmente nos queratinócitos, cólon, rim e placenta.

Apesar deste estudo ter contribuído para o conhecimento da síndrome de Kindler ainda persistem muitas dúvidas. O fato de as bolhas melhorarem com o tempo, mas serem substituídas por fotossensibilidade, poiquilodermia, atrofia e um risco aumentado no desenvolvimento de carcinomas cutâneos pode se dever ao fato de que a expressão da proteína kindlin-1 mude com o tempo, tornando a proteína essencial na infância para a adesão celular e com o passar dos anos diminua a contribuição relativa na manutenção da integridade cutânea, mas tenha associação com o mecanismo enzimático de reparação do DNA e com citocinas antiinflamatórias. Para que isso se caracterize seria necessário se determinar por PCR quantitativo à proteína kindlin 1 em varias etapas do envelhecimento cutâneo.<sup>29;30</sup>

Outras características clínicas intrigantes da síndrome incluem a fotossensibilidade, alterações pigmentares e a atrofia cutânea. O papel da kindlin 1 na adesão

celular foi demonstrado, mas certamente a proteína esta envolvida em outros mecanismos de regulação que ainda não foram elucidados. Estudos já revelaram associação da proteína com actina e vinculina, mas a natureza dessas associações ainda permanece desconhecida. O entendimento de outras possíveis associações pode ter implicações biológicas extremamente amplas, promovendo pistas não somente para o mecanismo das bolhas e fotossensibilidade, mas também para inflamação da mucosa, malignidades mucocutâneas, reparação tecidual, cicatrização e envelhecimento cutâneo.<sup>31</sup>

Logo, experimentos de biologia celular de interação e expressão proteica nos auxiliariam no entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelas variáveis características clinicas do pacientes portadores de síndrome de Kindler.

### **Considerações finais**

Foi estabelecido o heredograma dos pacientes afetados e evidenciou-se que as duas famílias estudadas possuem ancestrais semelhantes.

Foi realizado um registro acurado dos fenótipos clínicos que apresentam poiquilodermia, sinéquias, alterações de mucosa, constrictões esofágicas entre outros. Dois pacientes apresentaram carcinomas cutâneos como complicações tardias.

As alterações estruturais e de imunofluorescência das amostras foram estudadas e são sugestivas, mas não definitivas para Síndrome de Kindler.

A mutação dos pacientes estudados foi identificada e é uma inserção de uma citosina na posição 676 do exon 5 do gene KIND 1 que se localiza no cromossoma 20.

### **Agradecimentos**



Agradecemos aos pacientes com síndrome de Kindler e suas famílias pela participação neste projeto e ao suporte técnico do grupo de Genodermatose da Divisão de Genética e Medicina Molecular do King`s College School of Medicine, Londres, Inglaterra.

### Referência Bibliográfica

2. Kindler, T. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br.J.Dermatol* 66, 104-111. 1954.
3. Jobard F, Bouadjar B, Caux F *et al.* Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**: 925-35.
4. Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG *et al.* Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 2003; **73**: 174-87.
5. Ashton GH, McLean WH, South AP *et al.* Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome. *J.Invest Dermatol.* 2004; **122**: 78-83.
6. Ashton GH. Kindler syndrome. *Clin.Exp.Dermatol.* 2004; **29**: 116-21.
7. Penagos H, Jaen M, Sancho MT *et al.* Kindler syndrome in native Americans from Panama: report of 26 cases. *Arch.Dermatol.* 2004; **140**: 939-44.
8. Has C, Bruckner-Tuderman L. A novel nonsense mutation in Kindler syndrome. *J.Invest Dermatol.* 2004; **122**: 84-6.
9. Maleville J, Cavaroc Y, Boiron G *et al.* [Diffuse poikiloderma with acrokeratosis, preceded by bullous lesions: Weary-Kindler's disease. Nosologic and histopathologic discussion]. *Ann.Dermatol Venereol.* 1982; **109**: 949-56.

10. Weary PE, Manley WF, Jr., Graham GF. Hereditary acrokeratotic poikiloderma. *Arch.Dermatol* 1971; **103**: 409-22.
11. Bordas X, Palou J, Capdevila JM *et al.* Kindler's syndrome. Report of a case. *J.Am.Acad.Dermatol* 1982; **6**: 263-5.
12. Kapasi AY, Khopkar U, Raj S *et al.* Weary-Kindler syndrome with multiple seborrheic keratoses. *Int.J.Dermatol.* 1993; **32**: 444-5.
13. Krunic AL, Ljiljana M, Novak A *et al.* Hereditary bullous acrokeratotic poikiloderma of Weary-Kindler associated with pseudoainhum and sclerotic bands. *Int.J.Dermatol.* 1997; **36**: 529-33.
14. McGrath JA. Translational benefits from research on rare genodermatoses. *Australas.J.Dermatol* 2004; **45**: 89-93.
15. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, Rahbarizadeh F. Salting out method: highyield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005; **19(6)**: 229-32.
16. Sharma RC, Mahajan V, Sharma NL *et al.* Kindler syndrome. *Int.J.Dermatol.* 2003; **42**: 727-32.
17. Hacham-Zadeh S, Garfunkel AA. Kindler syndrome in two related Kurdish families. *Am.J.Med.Genet.* 1985; **20**: 43-8.
18. Alper JC, Baden HP, Goldsmith LA. Kindler's syndrome. *Arch.Dermatol* 1978; **114**: 457.
19. Al AK, Al HK, Al AD *et al.* Kindler syndrome in a Saudi kindred. *Clin.Exp.Dermatol.* 2002; **27**: 673-6.
20. Verret JL, Avenel M, Larregue M *et al.* [Kindler syndrome. Case report with ultrastructure study]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 1984; **111**: 259-69.
21. Forman AB, Prendiville JS, Esterly NB *et al.* Kindler syndrome: report of two cases and review of the literature. *Pediatr.Dermatol.* 1989; **6**: 91-101.

22. Shimizu H, Sato M, Ban M *et al.* Immunohistochemical, ultrastructural, and molecular features of Kindler syndrome distinguish it from dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch.Dermatol.* 1997; **133**: 1111-7.
23. Suga Y, Tsuboi R, Hashimoto Y *et al.* A Japanese case of Kindler syndrome. *Int.J.Dermatol.* 2000; **39**: 284-6.
24. Wiebe CB, Larjava HS. Abnormal deposition of type VII collagen in Kindler syndrome. *Arch.Dermatol.Res.* 1999; **291**: 6-13.
25. Lanschuetzer CM, Muss WH, Emberger M *et al.* Gene symbol: Kind1. Disease: kindler syndrome. *Hum.Genet.* 2004; **115**: 175.
26. Thomson MA, Ashton GH, McGrath JA *et al.* Retrospective diagnosis of Kindler syndrome in a 37-year-old man. *Clin.Exp.Dermatol.* 2006; **31**: 45-7.
27. Burch JM, Fassihi H, Jones CA *et al.* Kindler syndrome: a new mutation and new diagnostic possibilities. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 620-4.
28. Fassihi H, Wessagowit V, Jones CA. Neonatal diagnosis of Kindler syndrome. *J Dermatol Sci* 2005; **39**: 183-5.
29. Sadler E, Klausegger A, Muss W *et al.* Novel *KIND1* gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 1619-24
30. Emanuel PO, Rudikoff D, Phelps RG. Aggressive squamous cell carcinoma in kindler syndrome. *Skinmed.* 2006; **5**: 305-7.
31. Lotem M, Raben M, Zeltser R, Landau M, Sela M, Wygoda M *et al.* Kindler syndrome complicated by squamous cell carcinoma of the hard palate: successful treatment with high-dose radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br.J.Dermatol.* 2001; **144**: 1284-6.

## 7. ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL – INGLÊS

Submetido para o Gene Corner Section do British Journal of Dermatology em janeiro de 2007

### **Homozygous recurrent mutation, c.676insC, on two different *KIND1* genetic backgrounds in a Brazilian pedigree with Kindler syndrome.**

B.C.F. Martignago\*, J.E. Lai-Cheong†, L. Liu†, J.A. McGrath†, T.F. Cestari\*

\*Service of Dermatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; †Genetic Skin Disease Group, St John's Institute of Dermatology, Division of Genetics and Molecular Medicine, The Guy's, King's College and St Thomas' Hospitals' Medical School, London, United Kingdom.

#### **Correspondence**

B.C. de Faria Martignago

e-mail: [beatrizmartignago@gmail.com](mailto:beatrizmartignago@gmail.com)

**Conflict of interest:** None

## Summary

*Background:* Kindler syndrome (KS) is a rare autosomal recessive disease characterized by acral bullae in infancy that diminished with time, photosensitivity, persistent progressive poikiloderma and severe cutaneous atrophy. Since the first report more than 100 cases have already been described but the association with acrokeratotic poikiloderma and epidermolysis bullosa has often misled the diagnosis. The molecular study of Brazilian patients with Kindler syndrome was never performed.

*Objectives:* To assess the clinical features and the molecular basis of KS in patients from South Brazil and to examine molecular evidence for a mutation.

*Patients and methods:* This study is a series of seven patients from Hospital de Clinicas de Porto Alegre. The KS affected individuals were examined clinically and a structured recording sheet was completed. Samples were collected after informed consent and with Ethics committee approval.

*Results:* The most consistent clinical signs for a diagnosis was blisters in childhood, photosensitivity and poikiloderma. A mutation in exon 5 was identified in the two distinct families that after family tree showed to have relatives in common that came from the same region in Italy more than three generations ago.

*Conclusions:* These findings are very important to report a rare but well characterized syndrome and to increment detection strategies. The elucidation of the existent mutations is equally important in the developing of new treatments and in the management of the affected patients.

*Key words:* blister, cytoskeleton, genodermatosis, photosensitivity, poikiloderma

## Introduction

Kindler syndrome (KS) (OMIM 173650) is a rare autosomal recessive skin and mucous membrane disorder associated with trauma-induced blisters and erosions, poikiloderma and variable degrees of photosensitivity.<sup>1</sup> In 2003, the KS gene (*KIND1*) for this genodermatosis was identified through genetic linkage and candidate gene analysis.<sup>2,3</sup> Loss-of-function mutations were found in *KIND1* encoding a 677 amino acid protein called kindlin-1 (previously also known as kindlerin) which is involved in linking the actin cytoskeleton to focal contacts, predominantly in basal keratinocytes.<sup>2-7</sup>

Thus far, 25 different mutations in *KIND1* in individuals with KS have been published, most of which lead to loss of *KIND1* mRNA and kindlin-1 protein expression.<sup>2,3,8-15</sup> Nine *KIND1* mutations have been reported in more than one family, either as propagated ancestral alleles (IVS7-1G>A, p.E304X, p.W616X, c.1161delA, g.70250\_74168del, c.373delT) or as recurrent mutations in various ethnic groups (c.676insC, p.R271X, p.R288X).<sup>8,11</sup> Of note, although the mutation c.676insC has only been reported previously in Pakistani individuals, two different mutant *KIND1* allelotypes have been reported in association with this frameshift.<sup>8</sup> In this report, we describe the identification of the mutation c.676insC in a Brazilian pedigree. Affected individuals were shown to be homozygous for the frameshift but, intriguingly, two new different *KIND1* mutant allele haplotypes were demonstrated which created the very unusual finding of heterozygous single nucleotide polymorphisms alongside the same homozygous pathogenic *KIND1* mutation in two branches of the same family.

## Cases and methods

The affected individuals are descendants of immigrants who came to Porto Alegre (Brazil) in the early 20<sup>th</sup> Century from Treviso (Italy). Part of the pedigree (illustrated in

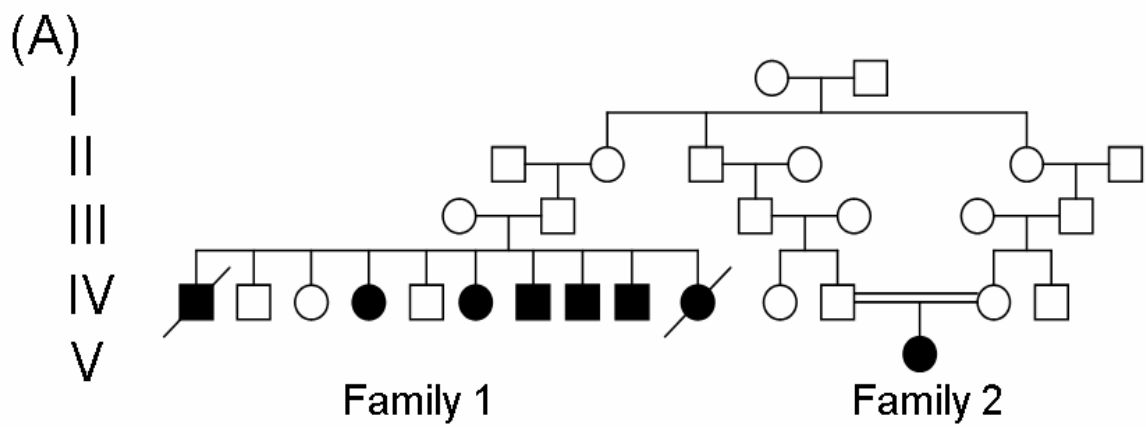
Figure 1A and referred to as Family 1) is non-consanguineous and in generation IV contains three unaffected individuals and seven siblings with KS, two of whom died prematurely from skin fragility/infection. The part of the pedigree referred to as Family 2 is consanguineous and in generation V contains one individual with KS. The clinical features in affected subjects comprised trauma-induced blistering, photosensitivity and poikiloderma as well as periodontal inflammation and severe oesophageal stenosis requiring frequent dilatations (Figure 1B). Of note, two KS individuals from Family 1 developed skin malignancy (squamous cell carcinoma on the leg in a 46-year-old male and basal cell carcinoma on the breast in a 35-year-old female). Non-melanoma skin cancer in KS has previously been reported in a 43-year old Italian male patient with the homozygous splice site mutation IVS7-1G>A who had squamous cell carcinomas of both the upper lip and dorsal aspect of the hand and a 52-year old Italian female patient with the homozygous mutation c.95\_96delGA, who had a squamous cell carcinoma of the lower lip.<sup>8,11</sup> Two other cases of KS with squamous cell carcinoma have been described but the mutations in these subjects have not been delineated.<sup>16,17</sup>

Following ethical approval from the Human Research Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre and in compliance with the Helsinki Accord, blood samples were taken for DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplification and gene sequencing of *KIND1*. Briefly, PCR amplification of genomic DNA was carried out using 14 pairs of primers spanning the coding exons and flanking introns of the *KIND1* gene, as described elsewhere.<sup>3,8</sup> The PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Crawley, UK) and sequenced in an ABI 310 genetic analyser (Applied Biosystems, Warrington, UK).

## Results and discussion

Mutational analysis disclosed a homozygous single nucleotide insertion mutation, c.676insC, in exon 5 of *KIND1* in all affected individuals screened for KS (Figure 2A). Because this particular frameshift mutation has been reported previously in several Pakistani families,<sup>8,13</sup> we carried out *KIND1* haplotype analysis, typing for several intragenic (exonic and intronic) polymorphisms, as reported previously.<sup>8,11</sup> The analysis showed that the haplotype in the affected Brazilian individuals was different from either of the two Pakistani haplotypes reported. This is consistent with the mutation c.676insC being a recurrent mutation, probably arising as a consequence of slippage during DNA replication of a run of seven cytosine nucleotides. Surprisingly, however, haplotype analysis showed that the mutant alleles were different in Family 1 and 2 (Figure 2B and Table 1). In consanguineous Family 2 the affected individual was homozygous for all polymorphic markers but in non-consanguineous Family 1, affected individuals were heterozygous for two single nucleotide polymorphisms in intron 4, notwithstanding that the mutation c.676insC was present on both *KIND1* alleles. Although DNA from earlier generations was not available for analysis, it is likely that all three siblings in generation II were asymptomatic carriers of the same mutant c.676insC allele and that the mother of the affected siblings in Family 1 is a heterozygous carrier of the same mutation on a different genetic background. The occurrence in a single family of the same rare mutation that causes a very rare disease arising on two different mutant alleles is extremely unusual and serves as a useful reminder to avoid assumptions of consanguinity when homozygous mutations are delineated, especially for uncommon inherited diseases.

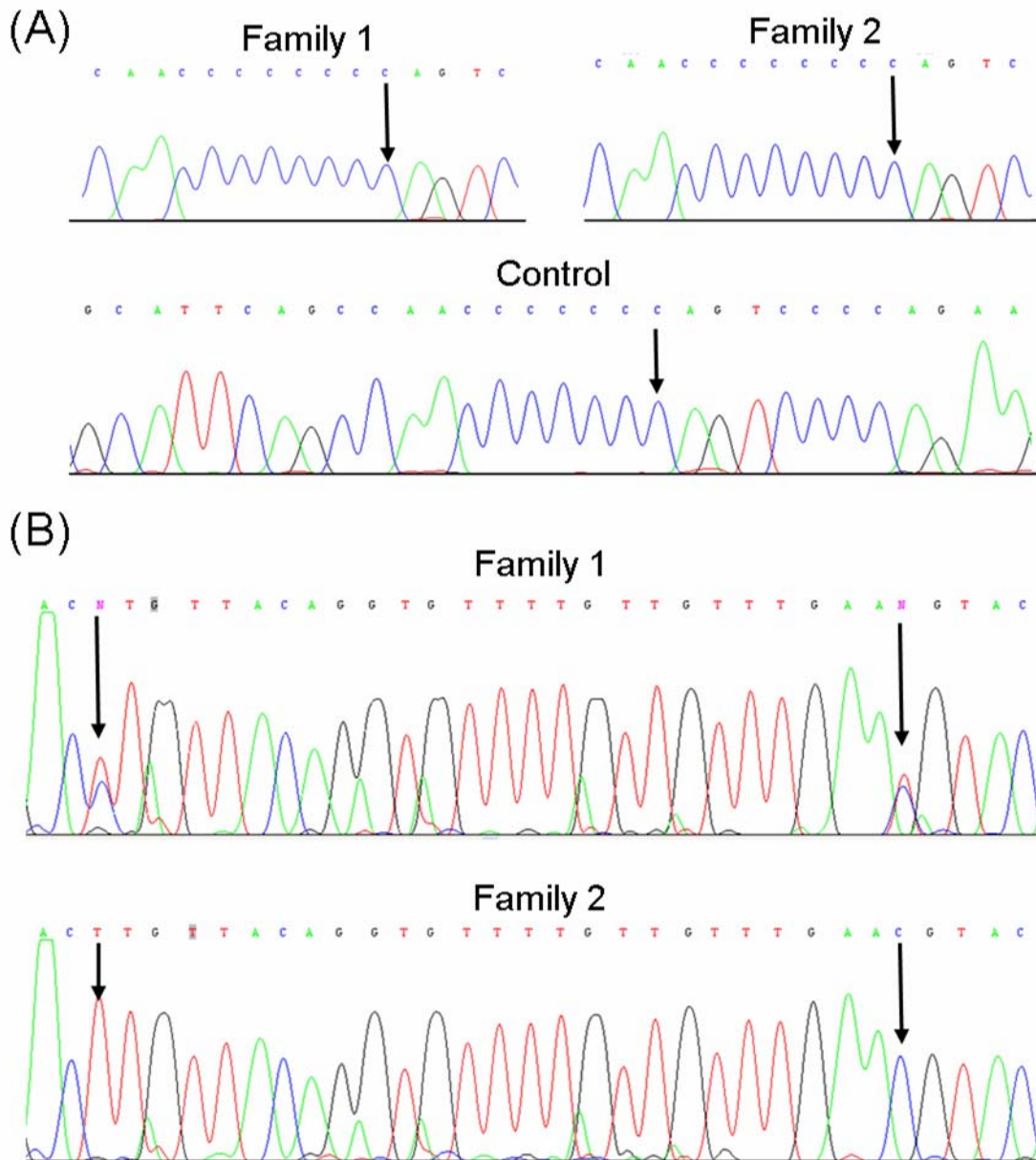




(B)



**Figure 1.** (A) Brazilian pedigree with Kindler syndrome. In Family 1, generation IV contains 7 affected siblings, two of whom are deceased. In Family 2, consanguinity is present and there is one individual with Kindler syndrome in generation V. (B) Clinical features of Kindler syndrome in this Brazilian Family. Poikiloderma is evident on the face, neck and hands and ulceration is present on the lower lip.



**Figure 2.** (A) Sequencing of genomic DNA from affected individuals in Family 1 and Family 2 reveals homozygous insertion of a cytosine at position 676 in exon 5 of the *KIND1* gene, c.676insC (arrows). In control DNA, there are 7 instead of 8 cytosine nucleotides. (B) Sequencing of two single nucleotide polymorphisms within intron 4 of the *KIND1* gene (IVS4+8T/C and IVS4 +34C/T) reveals heterozygosity for both polymorphisms in individuals from Family 1 but nucleotide homozygosity in the one affected individual in Family 2.

**Table 1.** Haplotype analysis for single nucleotide polymorphisms in the *KIND1* gene associated with the mutation c.676insC. Previously, two different mutant allelotypes have been demonstrated in Pakistani individuals (see reference 8 for more details). In the Brazilian pedigree, haplotyping reveals two additional mutant alleles which are both different from the Pakistani haplotypes. Of note, the individuals with Kindler syndrome in Family 1 are homozygous for c.676insC but heterozygous for two single nucleotide polymorphisms in intron 4.

KIND1 Polimorphisms Families	Exon	Mutation (676insC)				
		Pakistan 1	Pakistan 2	Brazil 1		Brazil 2
		Butt(6737)	6636	737	738	739
IVS1-11T/G	2	G	G	G	G	G
114T/C	2	C	C	C	C	C
IVS2+20C/T	2	C	C	C	C	C
IVS2-4G/A	3	A	G	A	A	A
479T/C	4	T	C	T	T	T
IVS4+8T/C	4	C	T	T/C	T/C	T
IVS4+34C/T	4	T	C	C/T	C/T	C
IVS4-25A/	5	A	G	A	A	A
IVS4-17A/	5	A	C	A	A	A
IVS5-17A/C	6	C	T	A	A	A
772T/C	6	C	T	T	T	T
IVS6-50 T/	7	/	/	T	T	T
IVS7-46A/G	8	/	/	IVS7- 50-8	IVS7- 50-8	G
IVS8+48A/	8	/	/	A	A	A
1575G/A	12	G	/	A	A	A
1577A/G	12	A	/	G	G	G
1695T/C	13	T	C	T	T	T
IVS13+52C/T	13	/	/	C	C	C

## Acknowledgements

We thank all subjects for their participation in the study. Support for the project was kindly provided by the Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association (DeBRA UK) and the Barbara Ward Children's Foundation.

## References

1. Kindler T. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br J Dermatol* 1954; **66**: 104-11.
2. Jobard F, Bouadjar B, Caux F *et al*. Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 925-35.
3. Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG *et al*. Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 174-87.
4. White SJ, McLean WH. Kindler surprise: mutations in a novel actin-associated protein causes Kindler syndrome. *J Dermatol Sci* 2005; **38**: 169-75.
5. Ashton GH. Kindler syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2004; **29**: 116-21.
6. Kloeker S, Major MB, Calderwood DA *et al*. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem* 2004; **279**: 6824-33.
7. Herz C, Aumailley M, Schulte C *et al*. Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 36082-90.

8. Ashton GH, McLean WH, South AP *et al.* Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 78-83.
9. Has C, Bruckner-Tuderman L. A novel nonsense mutation in Kindler syndrome. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 84-6.
10. Sethuraman G, Fassihi H, Ashton G *et al.* An Indian child with Kindler syndrome resulting from a new homozygous nonsense mutation (C468X) in the *KIND1* gene. *Clin Exp Dermatol* 2005; **30**: 286-8.
11. Has C, Wessagowit V, Pascucci M *et al.* Molecular basis of Kindler syndrome in Italy: novel and recurrent Alu/Alu recombination, splice site, nonsense, and frameshift mutations in the *KIND1* gene. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 1776-83.
12. Fassihi H, Wessagowit V, Jones CA. Neonatal diagnosis of Kindler syndrome. *J Dermatol Sci* 2005; **39**: 183-5.
13. Thomson MA, Ashton GH, McGrath JA *et al.* Retrospective diagnosis of Kindler syndrome in a 37-year-old man. *Clin Exp Dermatol* 2006; **31**: 45-7.
14. Burch JM, Fassihi H, Jones CA *et al.* Kindler syndrome: a new mutation and new diagnostic possibilities. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 620-4.
15. Sadler E, Klausegger A, Muss W *et al.* Novel *KIND1* gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 1619-24
16. Lotem M, Raben M, Zeltser R *et al.* Kindler syndrome complicated by squamous cell carcinoma of the hard palate: successful treatment with high-dose radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Dermatol* 2001; **144**: 1284-6.
17. Emanuel PO, Rudikoff D, Phelps RG. Aggressive squamous cell carcinoma in Kindler syndrome. *Skinmed* 2006; **5**: 305-7.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. O acompanhamento das famílias envolvidas no estudo é de suma importância tanto para o seguimento da evolução da moléstia como para proporcionar o aconselhamento genético para quem desejar.
2. Os resultados do seqüenciamento dos membros afetados e controles sem sinais da síndrome poderiam ser comparados para verificação de sua expressão nos diferentes fenótipos.
3. As famílias afetadas estudadas neste projeto possuem uma linhagem em comum, mas também possuem ancestrais diferentes. A identificação das famílias envolvidas é importante para o rastreamento de novos possíveis casos de pacientes afetados e portadores.
4. Após a realização do estudo tornou-se possível iniciar o estabelecimento de rotinas para a detecção de novos casos a partir de exame clínico e laboratorial
5. O conhecimento adquirido nesta pesquisa foi proporcionado pelo laboratório do professor John McGrath que não só foi o pioneiro mas também é o detentor da maior experiência mundial no estudo genético e estrutural da Síndrome de Kindler. Fica a proposta do desenvolvimento da técnica no Brasil em colaboração com a participação estrangeira e a continuação de estudos que possam implementar estratégias de detecção, ampliar conhecimento clínico e buscar alternativas terapêuticas.

**ANEXOS**

## ANEXO 1: FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

- Nome do paciente:.....
- Prontuário: ..... • Descendência:.....
- Idade: ..... • Sexo: .....
- Procedência:.....
- Profissão/atividade:.....
- Data do diagnóstico:.....
- Diagnóstico: .....

Exame anátomo-patológico:.....

.....

..... Material de análise.....

Microscopia eletrônica :.....

..... Material de análise.....

Imunofluorescência .....

..... Material de análise.....

Mutação:.....

Comprometimento :

<b>Acometimento</b>	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>	<b>Método Diagnóstico</b>
Bolhas acrais			
Atrofia cutânea			
Poiquilodermia			
Eczema			



Hiperkeratose Acral			
Fotossensibilidade			
Alterações da mucosa oral			
Alterações ungueais			
Sinéquias nos dedos			
Consanguinidade			
Familiares afetados			
Neoplasias			
Ossos			
Trato respiratório			Laringoscopia( ) Sintomas inespecíficos ( )
Trato urinário			Uretroscopia( ) Sintomas inespecíficos ( )
Trato Gastrointestinal			EDA ( ) Sintomas inespecíficos ( )
Olhos			
Sintomas Gerais			Febre( ) Emagrecimento( )
Outros			

- Descrição da lesão cutânea:.....  
.....  
.....
- Localização: .....  
.....
- Lesão mucosa? Descrição:.....  
.....  
.....

- Tratamento instituído:.....  
.....  
.....

- Fotografias:

Data.....

Local.....

Regime.....

## **ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Justificativa:** As bases genéticas da síndrome de Kindler permaneceram um mistério, até que em 2003 dois grupos relataram a identificação de mutações em uma nova proteína. Estes novos conhecimentos proporcionam informação mais detalhada para os pacientes, permitem a realização de diagnósticos com maior acurácia e auxiliam na melhora do aconselhamento genético. Já foram determinadas 17 diferentes complicações nos genes em 41 famílias de diferentes partes do mundo, mas, nenhuma família brasileira foi estudada.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre a Síndrome de Kindler e gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Nós esperamos que este trabalho leve a progressos no diagnóstico e tratamento da síndrome de Kindler. A investigação proposta pode não ser de ajuda direta ao nosso paciente ou sua família, mas nos ajudará a entender sua condição de pele melhor e também pode beneficiar outros indivíduos afetados bem como avaliar a probabilidade de seus descendentes serem afetados.

Os participantes deste estudo serão solicitados a retirar amostra de sangue (10 ml ou duas colheres de chá) para análise genética, buscando a identificação de complicações nos genes e realização de biópsia cutânea (4mm ou tamanho de uma lentilha) para um teste especial no laboratório. A retirada de sangue poderá deixar um hematoma que irá regredir completamente e a realização da biópsia, sob anestesia local, poderá gerar um desconforto e deixará uma cicatriz pequena e permanente. No desenvolvimento e padronização de novos testes pode ser necessário utilizar parte da amostra anonimamente. Os resultados do teste serão estritamente confidenciais e fornecidos somente ao pesquisador e ao paciente. Os resultados podem ser fornecidos a outros médicos somente com o consentimento do paciente. Os pacientes realizarão um exame dermatológico e as lesões encontradas serão fotografadas e

somente serão utilizadas para fins científicos. Os riscos do estudo são aqueles da coleta de sangue e da biópsia. Será respeitada a recusa do paciente. O paciente poderá se retirar da investigação em qualquer estágio sem necessidade de justificativa e isto não acarretará em prejuízo no seu cuidado pela equipe médica.

A assinatura, neste consentimento informado, dará autorização ao pesquisador do estudo para utilizar os dados obtidos quando se fizerem necessários e somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu,.....  
 assino e identifico este documento, declaro ter recebido explicação clara e completa sobre a pesquisa acima mencionada. Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Autorizo o uso de minhas imagens somente para fins científicos, sempre preservando minha identidade. ( ) SIM ( ) NÃO

.....

Assinatura do Paciente ou do Responsável (se menor de 18 anos)

Dra. Beatriz Castellar de Faria Martignago (Médica - CRM: 27333)

CPF: 951113289-04 RG: 2576093 SSP/SC Telefone: (51) 98289694

Pesquisadora Responsável: Dra Tania Cestari Telefone: (51) 21018571

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua: Ramiro Barcelos, 2350 – Zona 13

Porto Alegre,..... de.....de 200.....

**ANEXO 3: SEQUENCIAMENTO DOS PRIMERS E ORGANIZAÇÃO  
DO INTRON-EXON DO KIND 1**

Primer	Seqüencia
KIND1F	AAATCTGCAGACTGCGCCTC
KIND1R	GAGGCTGCAGAAAGAAAGGG
KIND2F	ATATCTGGAGCACCTGGAAC
KIND2R	ATTGCTCTCCAGGGCATTAC
KIND3F	TGAGGAGCTGGAGATCAGTT
KIND3R	GAAGTAGGCAGAATGCACAC
KIND4F	GACCCTGAGTCTTAGAAGGA
KIND4R	GCCTTTCCTCATCACATCAG
KIND5F	CAGTGCCCAGCTTGACTTAT
KIND5R	ATCCCTAGGCCTACCAACTT
KIND6F	CAGTGCTCAGAAAGTGTCAG
KIND6R	GCTAAACAGGCGATCACACA
KIND7F	CTGAGCTGAAGTTTGCTGCA
KIND7R	GTGTGTGGATTATGAGGAGC
KIND8F	AAGGAGACCTCTGTTTAGGA
KIND8R	CTTGTTAGGTGAAGAGCATC
KIND9F	GTAGCGAGTGTAACCTGAAG
KIND9R	ACCTTTGAACCATGAACCTG
KIND10F	TGCAGCGTGTTCCACATTTT
KIND10R	GGATTACAGGTTTGAGCCAC
KIND11F	ACAGATGCCTCAGAACTCAG
KIND11R	TGCTCTTTAGGCTTAGTGGAG
KIND12F	GCTTTGCACTTGAGCTTGCT
KIND12R	GTGCTGGAATTACAGGTGTG
KIND13F	CTAACAGGGTGATCACAGAG
KIND13R	CTAAATGAGAAAACCTGGGGCT
KIND14F	CTTCATTGTCCATTCTCTG
KIND14R	CAATTCTGAGGGACACACAT
KIND15F	CCAGTCCAGCAAAGCACTTT
KIND15R	GTCCAGAATCTACATGCTGG

## Organização do intron-exon do KIND 1

<b>Exon</b>	<b>Seqüência receptora 3'</b>	<b>Tamanho do exon (pb)</b>	<b>Seqüência doadora 5'</b>	<b>Tamanho do intron (pb)</b>
1		771	AAGGAGgtgggtgct	3201
2	tgttcagcaag <b>ACACCA</b>	169	AGATCAgtaagtact	3359
3	atthttgcag <b>ATATAT</b>	234	TCCTGAgtaagtaccc	3187
4	ttatttctag <b>ATATTA</b>	147	CATCAGgtaagacttg	1965
5	tgcttgcag <b>TAAGTC</b>	214	TGCAGGgtaaggacac	2663
6	cattttctag <b>TTGGCT</b>	103	CCTAAAgtaagcaact	9900
7	ttgtctctag <b>TATGAT</b>	108	CTACAGgtatgggaac	490
8	ttcattttag <b>TACCAC</b>	132	CTTTTGgtatgaactt	1913
9	tttttctag <b>GAGGAC</b>	50	ATTTAGgtaagtaaac	5899
10	gaatttgcag <b>GCCCAA</b>	125	TTAGAGgtaagagtac	1081
11	tgctctcag <b>GCTGCG</b>	107	GACCATgtgagtaaaa	2489
12	ttgctgcag <b>GAGAAT</b>	222	AAACAGgtactgttaa	901
13	ttctgttcag <b>CTGGGCC</b>	125	TGTCAGgtgattacaa	4462
14	ttcttttcag <b>ATTTAA</b>	142	CGGCAGgtaagtgaa	2089
15	cctcttcag <b>GTGGTC</b>	2282*		

Organização intron-exon do KIND 1 nucleotídeos em letras maiúsculas estão nos exons e em negrito são o final e o início de cada intron

\* tamanho do exon até o sinal de poliadenilação, AATAAA.