

Lucimara Collodoro Rocha

**Análise de polimorfismos do gene da fibrilina-1
em indivíduos portadores de hérnia inguinal através do
seqüenciamento de DNA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Cardiologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Consuelo Junqueira
Rodrigues

**São Paulo
2007**

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Sonia e ao meu pai Macdonal,
os maiores exemplos de amor, dedicação,
companheirismo, força, inteligência e alegria,
aos quais devo cada dia da minha vida.
Vocês são preciosos demais!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Consuelo Junqueira Rodrigues, pela oportunidade e confiança em mim depositadas na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aldo Junqueira Rodrigues, por abrir as portas do laboratório para a execução deste projeto.

À Gina Camillo Rocha Silvestre, que se tornou uma grande amiga e grande exemplo profissional, pela essencial orientação, paciência, carinho e atenção do início até o último minuto dedicado a este trabalho.

À Priscila Magro, que acompanhou todo o desenvolvimento prático deste estudo, dando uma grande ajuda e por sua amizade e constante incentivo.

À Alessandra Teixeira Marinho, Jymenez de Moraes, Priscila Iovine, Alexandre Queiroz Silva, colegas de laboratório, pela amizade e tantas histórias compartilhadas.

Aos pacientes, cuja colaboração foi essencial para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Sonia Maria Collodoro Rocha e ao meu pai Macdonal Rodrigues Rocha, que são meu grande orgulho, pelo apoio incondicional sempre e infinita dedicação e educação.

À minha irmã, médica, confidente e melhor amiga Lizandra Collodoro Rocha que, apesar da distância, sempre esteve comigo todo o tempo, apoiando e de braços abertos em todos os momentos, desde o meu nascimento.

À minha avó, Amábile Lanza Collodoro e ao meu avô Paulo Collodoro (in memoriam) por todo carinho e momentos divertidos e inesquecíveis, que só os melhores avós podem explicar...

Às minhas grandes amigas Tatiana França e Marli Thereza Lazzuri Pezzolo, pela força, por tantos momentos deliciosos juntas. Vocês são amigas à toda prova!

Às secretárias Shirley, Leide e Mariliza (LIM-02) e Neusa, Juliana e Eva (pós-graduação/ InCor) pela grande ajuda em tantas situações que, sozinha, não conseguiria realizar.

Ao Prof. Dr. Ruy Geraldo Bevilacqua, pela colaboração na análise estatística.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro.

E ao meu namorado e grande amigo Rubem Sabatini Lazzuri, que com seu imenso amor, companheirismo e paciência, é essencial em cada minuto da minha vida hoje e indispensável em cada momento do meu futuro.

	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Lista de Abreviaturas	
	Resumo	
	Summary	
1	Introdução	1
1.1	Aspectos epidemiológicos da hérnia inguinal	2
1.2	O colágeno na fáscia transversal	6
1.3	As fibras elásticas	10
1.3.1	Elastina	10
1.3.2	Microfibras	13
1.3.3	Fibrilina-1	15
1.3.4	Estrutura da fibrilina-1	19
1.3.5	Mutações no gene FBN1	22
1.3.6	Fibrilina-1, Fibrilina-2 e Fibrilina-3	25
2	Objetivo	29
3	Métodos	31
3.1	Casuística	31
3.2	Métodos	32
3.2.1	Extração do DNA genômico	32
3.2.2	Determinação espectrofotométrica do DNA	33
3.2.3	Determinação da qualidade do DNA por eletroforese em gel de agarose	34
3.2.4	Amplificação do DNA genômico pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	35
3.2.5	Análise do Polimorfismo do gene da fibrilina-1 pelo Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)	38
3.2.6	Purificação dos produtos de PCR	39
3.2.7	Seqüenciamento do gene da FBN1	41
3.2.8	Confrontação do genoma	42
3.3	Análise estatística	42
4	Resultados	44
4.1	Análise do polimorfismo do gene da FBN1 pela técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)	44
4.2	Análise do seqüenciamento do gene da FBN1	47
4.3	Análise estatística	52
5	Discussão	56
6	Conclusão	73
7	Anexo	75
8	Bibliografia	78

Lista de Figuras

Figura 1	A hérnia inguinal se apresenta quando uma porção do intestino delgado se introduz no canal inguinal.....	2
Figura 2	Morfologia ultraestrutural da fibrilina-1. Notar o aspecto de colar de contas.	16
Figura 3	Estrutura do gene da fibrilina-1 (FBN1).	21
Figura 4	“Splicing” na molécula de mRNA.	21
Figura 5	Foto da amplificação da PCR	38
Figura 6	Foto dos produtos da PCR amplificados e purificados. Notar “Low DNA Mass Ladder” para comparação do peso Molecular.	40
Figura 7	Análise do polimorfismo do éxon 31 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos com hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 7 e 8.	45
Figura 8	Análise do polimorfismo do éxon 31 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos sem hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas no indivíduo 18.	45
Figura 9	Análise do polimorfismo do éxon 27 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos com hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 2, 3, 6, 7 e 8.	45
Figura 10	Análise do polimorfismo do éxon 27 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos sem hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 11, 15, e 16.	45
Figura 11	Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do	

NHGRI (linha superior). Notar a inserção de adenina (A) entre os codons 1119 e 1120, entre as bases 3357 e 3358, levando a uma mudança de seqüência - GAT→AGA (asp → arg).48

Figura 12 Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de citosina (c) entre os codons 1116 e 1117, entre as bases 3348 e 3349, levando a uma mudança de seqüência - TGT→CTG (cys → leu).49

Figura 13 Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de guanina (g) no códon 1148, base 3443, levando a uma mudança de seqüência - CCC→CGC (pro → arg).50

Figura 14 Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 31 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de citosina (c) entre os codons 1282 e 1283, entre as bases 3846 e 3847, levando a uma mudança de seqüência - GAG→CGA (glu → arg).51

Lista de Tabelas

Tabela 1	Seqüência dos iniciadores dos exons estudados do gene da fibrilina-1.	35
Tabela 2	Dados da PCR para os exons 4, 24, 25, 26, 31, 32, 39, 41, 59, 65.	37
Tabela 3	Dados da PCR para o éxon 27.	37
Tabela 4	Dados da PCR para o éxon 13.	37
Tabela 5	Distribuição da variável Mutação GAT → AGA entre os codons 1119 e 1120 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n= 120).	52
Tabela 6	Distribuição da variável Mutação TGT → CTG entre os codons 1116/1117 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).	53
Tabela 7	Distribuição da Mutação CCC → CGC no códon 1148 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).	53
Tabela 8	Distribuição da variável Mutação GAG → CGA entre os codons 1282/1283 do éxon 31 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).	54

Lista de Abreviaturas

A: adenina

AA: aneurisma da aorta

ACC: Aracnodactilia Contratural Congênita

arg: arginina

asp: asparagina

C: citosina

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

cbEGF: *calcium binding epidermal growth factor*

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

cys: cisteína

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNTP: desoxirribonucleotídeo

DO: densidade ótica

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGF: *epidermal growth factor*

ELN: gene da elastina

Fbn1: gene murino da fibrilina-1

Fbn2: gene murino da fibrilina-2

FBN1: gene humano da fibrilina-1

FBN2: gene humano da fibrilina-2

FBN3: gene humano da fibrilina-3

FT: fáscia transversal

G: guanina

glu: glutamina

gly: glicina

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

HI: hérnia inguinal

HID: hérnia inguinal direta

HII: hérnia inguinal indireta

InCor/HCFMUSP: Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Kb: quilobase

kDA: quilodalton

KHCO₃: carbonato de potássio

leu: leucina

LIM02: Laboratório de Anatomia Médico-Cirúrgica 02

LTBP: *latent transforming growth factor binding protein*

M: Molar

MAGP: *microfibril-associated glycoproteins*

MASS: *mitral valve prolapse, aortic aneurysm, skeleton, skin*

MEC: matriz extracelular

MgCl₂: cloreto de magnésio

mg/mL: miligramas por mililitro

mL: mililitros

mM: milimolar

MMP-1: metaloproteinase-1

MMP-2: metaloproteinase-2

MMP-13: metaloproteinase-13

NaCl: cloreto de sódio

Na₂CO₃: carbonato de sódio

ng: nanogramas

NH₄Cl: cloreto de amônio

NHGRI: *National Human Genome Research Institute*

nm: nanômetros

OMIM: *On Line Mendelian Inheritance in Men*: banco de dados das diversas síndromes genéticas.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pmol: picomol

pro: prolina

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SMF: Síndrome de Marfan

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SSCP: *Single Strand Conformation Polimorphism*

SSG: Síndrome Shprintzen-Goldberg

T: timina

UMD: Universal Mutation Database

µg: micrograma

µL: microlitros

RESUMO

ROCHA, L.C. *Análise de polimorfismos do gene da fibrilina-1 em indivíduos portadores de hérnia inguinal através do seqüenciamento de DNA* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 89p.

A hérnia inguinal é uma doença multifatorial que emerge do orifício de Fruchaud, fechado somente pela fáscia transversal. Nos últimos tempos tem sido demonstrado que desordens dos elementos do tecido conjuntivo, como fibras colágenas e elásticas, estão relacionados com a gênese da hérnia inguinal. Estudos prévios demonstraram alterações estruturais e quantitativas das fibras elásticas com o envelhecimento da fáscia transversal, relacionado ao aparecimento de hérnia inguinal a partir da quinta década da vida. Estudos recentes demonstraram associação entre uma mutação pontual do éxon 20 do gene da elastina, componente amorfo das fibras elásticas, e hérnia inguinal em indivíduos do sexo masculino. A fibrilina-1 é o principal componente microfibrilar das fibras elásticas e está relacionada ao surgimento de síndromes genéticas, como Marfan, Ehlers-Danlos e Williams, que também apresentam indivíduos portadores de hérnias. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença de polimorfismos no gene da fibrilina-1 (FBN1) em indivíduos portadores de hérnia inguinal. Estudou-se o ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico de 60 pacientes com hérnia inguinal e 60 controles. Os exons 4, 13, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 39, 41, 59 e 65 foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase e, posteriormente, foram avaliados os polimorfismos em gel de poli(acrilamida). Todos os exons estudados apresentaram alguns indivíduos com padrão de bandejamento diverso. O produto de amplificação destes exons foi então avaliado através de seqüenciamento e confrontado com a base de dados do *National Human Genome Research Institute*. Alterações de inserção e/ou deleção consistentes foram observadas no éxon 27: 1) inserção de uma base entre os codons 1119 e 1120 (GAT → AGA); 2) inserção de uma base entre os codons 1116 e 1117 (TGT → CTG); 3) inserção de uma base no códon 1148 (CCC → CGC); e no éxon 31: inserção de uma base entre os codons 1282 e 1283 (GAG → CGA). Não houve significância estatística que indique associação entre o gene FBN1 e hérnia inguinal. Entretanto, como o gene da fibrilina-1 é bastante grande (350 kD, dividido em 65 exons) e, em outras doenças como a Síndrome de Marfan mais de 500 mutações já foram descritas, sem haver exons que possuam uma maior responsabilidade pela Síndrome, é possível que outros exons possam estar relacionados com o acometimento da hérnia inguinal.

SUMMARY

ROCHA, L.C. *Polymorphisms analysis of the fibrillin-1 gene in individuals with inguinal hernia by DNA sequencing [thesis]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 89p.

The inguinal hernia is a multifactorial disease that emerge from the Fruchaud orifice, closed only by the transversalis fascia. Lately it has been showed that disorders on the connective tissue elements, as the collagen and elastic fibers, are related to the inguinal hernia genesis. Previous studies have showed structural and quantitative changes of the elastic fibers at the transversalis fascia with aging, that may be related to inguinal hernia at the fifth decade of life. Recent studies have demonstrated an association among a punctual mutation on exon 20 of the elastin gene, amorfous component of the elastic fibers, and male individuals with inguinal hernia. The fibrillin-1 is the main microfibrillar component of the elastic fibers and is associated to genetic syndromes as Marfan, Ehlers-Danlos and Williams, that also present individuals with hernias. Thus, the objective of this study was to investigate the presence of polymorphisms on the fibrillin-1 gene (FBN1) on individuals who developed inguinal hernia. The desoxirribonucleic acid (DNA) of 60 individuals with inguinal hernia and 60 controls have been studied. The exons 4, 13, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 39, 41, 59 and 65 were ampified by the Polymerase Chain Reaction and later evaluated the polymorphisms on polyacrilamide gel. The amplification product of these exons were evaluated by DNA sequencing and compared to the *National Human Genome Research Institute database*. Consistent mutations were observed at exon 27: 1) insertion of a base between codons 1119 and 1120 (GAT → AGA); 2) insertion of a base between codons 1116 and 1117 (TGT → CTG); 3) insertion of a base on codon 1148 (CCC → CGC); and at exon 31: insertion of a base between codons 1282 and 1283 (GAG → CGA). There was no statistic significance that could indicate the association between FBN1 gene and inguinal hernia. However, FBN1 is a large gene (350 kD, shared in 65 exons) and in other disorders as Marfan Syndrome, more than 500 mutations have already been described, without the existence of prevalent exons that have major responsability about the Syndrome, it is possible that other exons could be related to the happening of inguinal hernia.

1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HÉRNIA INGUINAL

A importância da hérnia inguinal (HI) não se dá unicamente ao fato de tratar-se da mais freqüente hérnia do ser humano. Estima-se que um homem em cinco e uma mulher em 17 poderão desenvolvê-la ao longo de suas vidas. A hérnia também é a doença cirúrgica mais freqüente com uma incidência de mais de 10% da população total (SCHUMPELICK, 2006). Além disso, deve-se ter em mente também o enorme impacto sócio-econômico desta doença (READ, 1996), pois o índice de recidiva pós-tratamento varia de 5 a 30% (SCHUMPELICK *et al.*, 1994).

Em meados do século XVIII, os anatomistas da época entendiam que o desequilíbrio entre a pressão intra-abdominal juntamente com uma resistência localmente diminuída da parede abdominal ocasionaria a frouxidão ou mesmo a ruptura tecidual responsável pela hérnia inguinal (Figura 1).

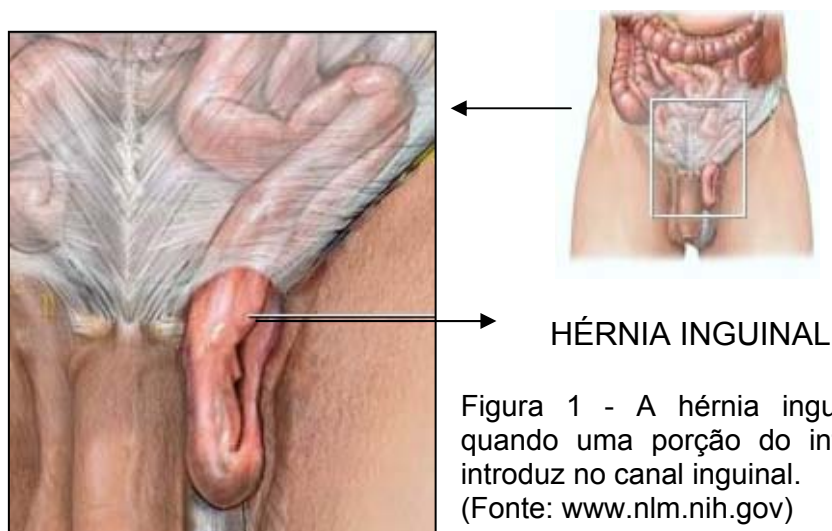


Figura 1 - A hérnia inguinal se apresenta quando uma porção do intestino delgado se introduz no canal inguinal.
(Fonte: www.nlm.nih.gov)

COOPER (1804) apud ABRAHAMSON (1998) descreveu a fáschia transversal (FT), assinalando o seu importante papel de proteção da parede abdominal contra o desenvolvimento da HI e relacionou como fatores desencadeantes: obesidade, tosse, obstipação intestinal, gravidez, ascite e o levantar de peso excessivo (todos fatores de aumento da pressão intra-abdominal) e, junto a estes, as dificuldades miccionais. Outros fatores também poderiam estar relacionados, como as causas congênitas (persistência do conduto peritônio-vaginal), ao lado de alterações adquiridas como a desnutrição e o envelhecimento.

No início do século XX, o entendimento sobre o evento da HI foi iniciado por RUSSEL (1906) com sua teoria sacular. O autor descreveu que a HI não poderia ser adquirida, pois em todos os indivíduos observava-se uma musculatura congenitamente enfraquecida, frente a um divertículo funicular peritoniais totalmente colabado.

A moderna herniologia, introduzida por Bassini na década de 1880, logo aceitou a teoria de Russel, que rejeita a visão de que qualquer hérnia pode ser adquirida no senso patológico (RUSSELL, 1906).

Já HARRISON, em 1922, demonstrou a improbabilidade da teoria sacular de Russel, já que a maioria dos homens apresenta o início da HI aos 50 ou 60 anos, longe de sua atividade mais vigorosa. E ainda, havendo ou não um processo vaginal maior ou menor, não seria suficiente de forma isolada para desencadear a hérnia se todos os demais elementos envolvidos estivessem funcional e anatomicamente íntegros e presentes, envolvendo o próprio conduto peritônio-vaginal. Além disso, os músculos também estão

normais na grande maioria dos casos, concluindo-se que a causa de uma hérnia inguinal, indireta ou direta, está na falência da FT em conseguir suportar a pressão intra-abdominal a que se submete.

A hérnia inguinal direta (HID) é resultado do enfraquecimento da FT no assoalho do canal inguinal (CONDON, 1978). Ao contrário, a etiologia da hérnia inguinal indireta (HII) em crianças e jovens é congênita; ela se desenvolve devido a presença de um processo vaginal ou de um ducto peritônio- vaginal não obliterado (GROSFELD, 1989). Já o aparecimento da hérnia inguinal indireta em adultos e idosos é correlacionado ao enfraquecimento da FT na margem do anel inguinal profundo (NYHUS *et al.*, 1960).

Foi um anatomista (KEITH, 1924), o primeiro a questionar esse dogma, declarando: “Nós estamos propensos a entender os tendões, as fáscias e o tecido conjuntivo como estruturas mortas e passivas. Certamente são estruturas vivas e, pelo fato das hérnias inguinais serem tão freqüentes e por vezes múltiplas em pacientes adultos e idosos, leva-nos a suspeitar que uma alteração patológica do tecido conjuntivo da parede abdominal pode predispor alguns indivíduos, particularmente propensos, às hérnias. Caso elas só ocorressem em pacientes com sacos herniários formados no período pré-natal, então deveríamos retirá-los logo após o nascimento ou então observar e não fazer nada, apenas confiando na sorte”.

Devido à crença de que as protrusões ocorriam por causa das variações congênitas na anatomia normal, seu conceito foi ignorado.

Só em 1964, WIRTSCHAFTER e BENTLEY verificaram que anormalidades do tecido conjuntivo pudessem ser causa de hérnias no homem. Basearam esta hipótese verificando a alta incidência de hérnia em pacientes portadores de latirismo e, em estudos experimentais ministrando latirógenos, conseguiram induzir hérnias em animais. O latirismo é uma desordem da ligação cruzada do colágeno, e os latirógenos mostraram estar associados à indução de hérnia.

As fibras colágenas constituem o componente de resistência e força da FT, proporcionando resistência às variações da pressão intra-abdominal (ABRAHAMSON, 1998). Já a elasticidade é fornecida pelas fibras elásticas maduras e elaunínicas, enquanto as fibras elásticas formadas apenas por constituintes microfibrilares - fibras oxitalânicas - fornecem resistência. As fibras elásticas maduras e elaunínicas são compostas por um arcabouço microfibrilar e grande quantidade de componente amorfo aí depositado - a elastina. A proteína fibrilina é o principal constituinte microfibrilar (ROSEMBLOOM *et al.*, 1993). Como a integração das fibras elásticas com as colágenas é fator relevante para a manutenção da resistência tecidual normal, então o evento da HI pode estar associado a uma deficiência isolada ou concomitante destes dois tipos de fibras.

1.2. O COLÁGENO NA FÁSCIA TRANSVERSAL

O colágeno foi o primeiro alvo de investigações no mecanismo de formação e recorrência da hérnia. É a proteína estrutural predominante, especialmente das fâscias, abrangendo 80% ou mais do peso seco da estrutura tecidual. Os defeitos identificados resultam na síntese lenta ou anormal do colágeno ou na atividade de protease aumentada que leva à degradação do colágeno. O resultado é um desequilíbrio da homeostase do colágeno, que leva à redução dos níveis, aumentando o risco de falha mecânica (READ, 2003).

Nas últimas três décadas foram realizados estudos mais específicos sobre a importância da fragilidade da parede posterior do canal inguinal no desenvolvimento da HI. Todos esses trabalhos têm o colágeno como principal atribuidor da resistência e integridade estrutural às aponeuroses e fâscias (WOLWACZ JUNIOR *et al.*, 2003).

READ, em 1970, observou que a bainha do músculo reto abdominal de pacientes portadores de HI era mais frágil e possuía menor peso por área que os pacientes-controle. Um ano depois, WAGH e READ (1971) observaram maior decréscimo de hidroxiprolina (e, portanto, colágeno), que representa cerca de 80% da bainha do músculo reto abdominal, em pacientes com hérnia inguinal direta do que naqueles com hérnia inguinal indireta. Entretanto, não conseguiram relacionar essa dismorfia ao envelhecimento ou ao peso magro corpóreo.

Em 1974, WAGH *et al.* relataram uma taxa de proliferação fibroblástica em culturas, menor que a normal, em pacientes com hérnia. À microscopia eletrônica, as fibrilas colágenas mostravam periodicidade irregular, diâmetros variados e depósitos intracelulares.

CANNON *et al.* (1981) estudaram indivíduos com HI, fumantes ou não, e verificaram que o fumante crônico pode danificar o tecido conjuntivo da virilha, bem como do pulmão. Esse estudo foi baseado na possibilidade de que a associação bem conhecida entre a HI e a doença pulmonar não estava relacionada simplesmente ao fato da tosse, e sim a um efeito metastático prolongado.

Em 1993, FRIEDMAN *et al.* demonstraram que a expressão gênica do colágeno tipo III e a síntese protéica estavam aumentadas em fibroblastos isolados e cultivados de pele de pacientes com HI, reduzindo a relação de colágeno tipo I/III. Estes mesmos pacientes apresentaram elevada expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do gene do colágeno tipo III, sem expressar diferença entre os portadores de HID e HII.

BELLÓN *et al.*, em 1997, verificaram que pacientes portadores de HID, mas não com HII, exibiam uma forte indução na expressão de metaloproteinase-2 tecidual (MMP-2) na fáscia transversal.

Estudando o saco herniário de pacientes com HID ou HII, KLINGE *et al.* (1999a), notaram que a razão do colágeno I/III estava bastante diminuída, mas os níveis de expressão de metaloproteinase-1 (MMP-1) e fibronectina não foram distintos entre pacientes e controles. Neste mesmo ano, KLINGE *et al.* (1999b) estudaram a pele de pacientes com HI e verificaram que a

razão dos colágenos tipo I/III por análise de “Western Blotting” estava significativamente diminuída. Além disso, num estudo imuno-histoquímico, os níveis de MMP-1, metaloproteinase-13 (MMP-13) e fibronectina se encontravam bastante diferentes entre pacientes e controles. Tais alterações refletem a alteração da integridade estrutural e mecânica do tecido e reforçam os indícios de que a HI deve ser tratada como manifestação local de uma doença sistêmica.

Nenhuma alteração foi relatada por PANS *et al.* (2001) em relação à razão do colágeno tipo I/III, mas a concentração do colágeno é aumentada em pacientes portadores de hérnia após digestão com pepsina para aqueles com HID.

Através da análise quantitativa do RNAm dos colágenos tipo I e III, MMP-1 e MMP-13, ROSCH *et al.* (2002) mostraram que existe aumento da expressão do RNAm do gene do colágeno tipo III, com conseqüente redução da relação entre RNAm do gene dos colágenos tipo I/III nos pacientes com HI quando comparados com indivíduos-controle.

Em análises de pele obtida de pacientes com doença herniária, BORQUEZ *et al.* (2003) verificaram feixes de colágeno desagregado com uma densidade diminuída de fibras colágenas.

WOLWACZ JUNIOR *et al.*, em 2003, demonstraram que a FT de pacientes com HID possuía somente 33% de colágeno, enquanto nos pacientes-controle a taxa era de 75%. Neste estudo não houve evidências de degeneração das fibras colágenas em relação ao envelhecimento. Pacientes com defeitos genéticos na síntese e metabolismo do colágeno,

como a *osteogenesis imperfecta* (TILSTRA e BYERS, 1994) possuem um risco elevado no desenvolvimento de hérnias inguinais recorrentes, assim como pacientes com história de aneurisma de aorta, uma doença também associada ao metabolismo do colágeno (LEHNERT e WADOUGH, 1992).

Em 2005, KAYAOGLU *et al.* demonstraram que as concentrações de cobre (que é um co-fator para a lisil oxidase, a qual está criticamente envolvida no metabolismo do colágeno) no plasma e no saco herniário estão mais baixas nos pacientes com HID do que nos portadores de HII.

Também em 2005, ABCI *et al.* verificaram que a expressão do tecido inibidor da metaloproteinase-2 da matriz (TIMP-2) está mais baixa em pacientes com HID do que em pacientes sem hérnia e operados logo após outra condição patológica.

Já TANIGUCHI *et al.*, em 2006 relataram existir uma diminuição da razão dos colágenos tipo I/III em pacientes adultos portadores de HI, mas não em crianças.

Assim, com estes resultados, pode-se verificar que a alteração na síntese do colágeno em pacientes com HI é decorrente da desregulação gênica e serve como fator iniciador ou promotor do desenvolvimento da HI.

1.3. AS FIBRAS ELÁSTICAS

Em organismos multicelulares, a função fisiológica de muitos tecidos depende de suas propriedades elásticas. Estas, bem como as propriedades de resistência de muitos tecidos dos vertebrados como expansibilidade pulmonar e elasticidade da aorta são devidas à presença das fibras elásticas na matriz extracelular (ROSENBLOOM *et al.*, 1993).

Nos vertebrados, a propriedade elástica se deve a uma estrutura complexa rica em proteínas e que está presente no tecido conjuntivo de diferentes órgãos. Esta estrutura, denominada de fibra elástica, forma na matriz extracelular uma rede de fibras que permite que determinados tecidos sofram expansão e retração sem que para isso ocorra injúria tecidual (ROSENBLOOM *et al.*, 1993). As fibras elásticas são compostas por dois componentes macromoleculares distintos: um componente amorfo, mais abundante e caracterizado pela elastina, e outro fibrilar, caracterizado pela fibrilina (ROSS e BORNSTEIN, 1969). Estas duas proteínas se encontram interligadas pelo fenômeno da elastogênese.

1.3.1. Elastina

Durante a elastogênese, a elastina é secretada para o meio extracelular na sua forma monomérica, a tropoelastina. Uma vez no espaço extracelular, moléculas de tropoelastina se polimerizam através de ligações cruzadas entre resíduos de lisina catalisada pela enzima lisil oxidase, dando

origem à elastina. O resultado deste processo é a formação de uma rede elástica insolúvel denominada sistema elástico (ROSENBLOOM *et al.*, 1993).

A elastina está virtualmente presente em todos os órgãos do corpo humano e, ainda que possa representar uma pequena porcentagem de um determinado tecido, desempenha função única e importante. É a presença da elastina que confere à fibra elástica a propriedade de ser grandemente deformada e retornar à sua configuração original, o que é fundamental para responder às súbitas alterações dinâmicas de estruturas vitais como a aorta e os pulmões (SANDBERG *et al.*, 1981). Em determinadas circunstâncias, a elastina pode aumentar seu comprimento em mais de 70% da conformação original, sem apresentar ruptura (GOH, 2003).

Em 1987, RODRIGUES JUNIOR demonstrou, em estudo histomorfométrico, a diminuição de fibras elásticas oxitalânicas na FT, responsáveis pela resistência elástica dos tecidos, em indivíduos acima de 55 anos. RODRIGUES JUNIOR *et al.* (1990), através de estudos de microscopia eletrônica, demonstraram alteração estrutural de fibras elásticas maduras na FT, como a fragmentação e a deposição de cálcio na elastina, em pacientes com mais de 50 anos.

Em 2000, QUINTAS *et al.* relataram que, com o envelhecimento, as fibras elásticas oxitalânicas da FT do ligamento interfoveolar (relacionado ao anel inguinal profundo) sofrem redução e as fibras elásticas maduras e elaunínicas encontram-se alteradas estruturalmente (espessas, curtas e encurvadas). Estas alterações são responsáveis pela diminuição da

complacência do ligamento interfoveolar, predispondo à hérnia inguinal indireta.

RODRIGUES JUNIOR *et al.* (2002) demonstraram diminuição na quantidade de colágeno e aumento na quantidade de fibras elásticas na fáscia transversal de indivíduos com hérnia inguinal indireta. Já nos indivíduos com hérnia inguinal direta, observaram-se alterações estruturais das fibras elásticas maduras e elaunínicas e redução da densidade de fibras oxitalânicas.

Com o envelhecimento, os componentes colágeno e elástico da matriz extracelular, apresentam alterações qualitativas e quantitativas como foi descrito na FT (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 1990; QUINTAS *et al.*, 2000), na pele (BRAVERMAN e FONFERKO, 1982; DANIELSEN e KOBAYASHI, 1972), no tecido muscular esquelético (RODRIGUES *et al.*, 1996; RODRIGUES e RODRIGUES JUNIOR, 2000), na cápsula esplênica (RODRIGUES *et al.*, 1999) e no ligamento interespinhoso (BARROS *et al.*, 2002). O que se observa é a redução de fibras oxitalânicas e o aumento da quantidade de fibras elásticas que contêm elastina. Entretanto, estas fibras elásticas apresentam distorção da sua estrutura e mostram-se como fibras espessadas, fragmentadas e tortuosas. Esta alteração arquitetural reduz sua elasticidade original devido à sua força original estar comprometida por redução de ligações hidrofóbicas, responsáveis pela estocagem de energia elástica (ROSENBLOOM, 1984).

Em 2003, YOO descreveu duas mutações pontuais no éxon 20 do gene da elastina em indivíduos do sexo masculino com HI. Essas mutações

foram caracterizadas por uma dupla troca no códon 404, onde o aminoácido fenilalanina (TTT) passou a codificar o aminoácido serina (TCC) e no códon 422, com a substituição do aminoácido serina (AGT) por glicina (GGT). Essas alterações podem tornar a proteína mais hidrofílica, o que favorece a ação de enzimas proteolíticas e contribui para o enfraquecimento tecidual e desenvolvimento da HI. Mais recentemente este estudo foi ampliado, verificando-se uma associação significativa entre a mutação pontual do códon 422 do éxon 20 da ELN e a HI (RODRIGUES *et al.*, 2006).

1.3.2. Microfibras

O componente fibrilar é composto por um grupo de fibrilas denominado microfibras. Estas são lançadas ao meio extracelular por fibroblastos, células mesenquimais e outras células, onde a elastina é depositada, ou não. Esta estrutura é que indica a forma e a direção da futura fibra elástica (ROSS, 1973).

As microfibras são estruturas fibrosas, cujo diâmetro é menor que 20 nm (LOW, 1962) e podem ser classificadas em dois grupos: microfibras de 3-5 nm ou microfibras de 8-10 nm de diâmetro (HAY, 1978). As microfibras de 3-5 nm de diâmetro estão conectadas a proteoglicanos na matriz extracelular e são compostas por colágeno tipo VI (FURTHMAYR *et al.*, 1983) enquanto as microfibras de 8-10 nm estão associadas à membrana basal e às fibras elásticas (CLEARY e GIBSON, 1983).

Durante a morfogênese, as microfibras são depositadas na matriz extracelular antes do componente amorfo, servindo de arcabouço para a deposição da elastina durante a elastogênese (ROSS, 1973). Estas microfibras associadas à elastina podem ser encontradas principalmente na derme, pulmão, artérias, glomérulo renal, músculo, tendões e cartilagem (SAKAI *et al.*, 1986). Portanto, depósitos de elastina aparecem primeiramente dentro dos feixes de microfibras e gradualmente entram em coalescência, enquanto as microfibras são lentamente deslocadas para a periferia ou incorporadas ao núcleo da elastina. Há também algumas regiões do corpo, como o ligamento periodontal ou os ligamentos suspensórios do cristalino, onde são encontrados pouco ou nenhum elemento elástico associado às microfibras (SAKAI *et al.*, 1986).

As microfibras possuem um papel multifuncional na matriz extracelular:

- 1- formam um arcabouço para a deposição de tropoelastina (FAHRENBACH *et al.*, 1966);
- 2- conferem propriedades mecânicas que auxiliam na redistribuição da força entre fibras elásticas adjacentes (KEENE *et al.*, 1991);
- 3- fornecem ancoragem estrutural a tecidos não elásticos como no caso dos ligamentos do cristalino (WHEATLEY *et al.*, 1995);
- 4- atuam como elemento de ancoragem de células endoteliais e epiteliais às fibras elásticas presentes na matriz extracelular (SAKAMOTO *et al.*, 1996);
- 5- possuem capacidade de adesão plaquetária (ROSS *et al.*, 1998) e

6- atuam como elemento regulatório da ativação e sinalização de fatores de crescimento (NEPTUNE *et al.*, 2003; ARTEAGA-SOLIS *et al.*, 2001).

Em 1986, SAKAI e colaboradores isolaram e caracterizaram o principal constituinte das microfibras de 8-10 nm, uma glicoproteína de 350 kDA que foi denominada de fibrilina. Além da fibrilina, outros componentes associados às microfibras já foram isolados e caracterizados: as Microfibril-associated glycoproteins – glicoproteínas associadas às microfibras (MAGPs) 1 a 4 (GIBSON *et al.*, 1996; HENDERSON *et al.*, 1996); Latent transforming growth factor β -binding protein – fator de crescimento transformador latente β ligado à proteína (LTPBs) 1, 2, 3 e 4 (OLOFSSON *et al.*, 1995; MOREN *et al.*, 1991; GILTAY *et al.*, 1997) e emilina; além de vários proteoglicanos e glicosaminoglicanos que podem estar associados às microfibras como o sulfato de heparan, decorin, biglican e versican (TIEDEMANN *et al.*, 2001; TRASK *et al.*, 2000; REINBOTH *et al.*, 2002; ISOGAI *et al.*, 2002).

1.3.3. Fibrilina-1

Em 1986, SAKAI *et al.* isolaram culturas celulares de fibroblastos humanos e identificaram uma glicoproteína de 350 kD, a qual denominaram fibrilina, que é o principal componente das microfibras. Utilizando anticorpos monoclonais específicos para a fibrilina, juntamente com técnicas de microscopia eletrônica, demonstrou-se sua distribuição nas matrizes dos

tecidos conjuntivos da pele, pulmão, rim, sistema vascular, cartilagem, tendão, músculo, córnea e zônula ciliar, associadas à elastina ou não.

Em 1991, visando a purificação e caracterização da fibrilina, SAKAI *et al.*, utilizando técnicas de imunolocalização, demonstraram que as moléculas de fibrilina são secretadas das células na sua forma monomérica e que, no meio extracelular, elas se polimerizam formando as microfibras. Além disso, viram que a disposição da fibrilina nas microfibras segue um arranjo paralelo, no sentido cabeça-cauda, semelhante a um colar de contas (Figura 2). Os autores também demonstraram que a fibrilina contém aproximadamente 14% de cisteína.

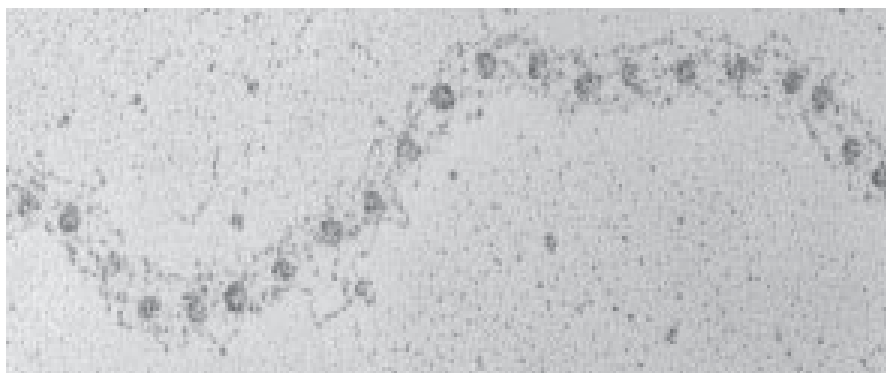


Figura 2 – Morfologia ultraestrutural da fibrilina-1. Notar o aspecto de colar de contas. Fonte: Carta *et al.* (2005), modificado.

Em 1991, foi identificado o gene da fibrilina e estabelecido o seu envolvimento na Síndrome de Marfan (OMIM #154700), uma doença do tecido conjuntivo herdada de forma autossômica dominante (LEE *et al.*, 1991; MASLEN *et al.*, 1991), caracterizada principalmente por deformidades esqueléticas (*pectus carinatum*, *pectus excavatum*, *pés planus*, escoliose), oculares (*ectopia lentis*) e cardiovasculares (dilatação da aorta, prolapso da

válvula mitral). Também podem apresentar deformidades pulmonares, epiteliais e tegumentares (PYERITZ, 2000).

Um primeiro trabalho, importante para a posterior identificação do gene da fibrilina através de técnica de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos monoclonais contra a fibrilina e cultura de fibroblastos de amostras de pele de indivíduos com SMF, demonstrou que as microfibras apresentavam um padrão alterado (em quantidade e distribuição da fibrilina) em tecidos de pacientes afetados, quando comparados a indivíduos normais (HOLLISTER *et al.*, 1990). GODFREY *et al.* (1990), utilizando essa mesma metodologia, também obtiveram resultados semelhantes.

Outros estudos foram realizados para identificar a região cromossômica ligada à SMF. Um destes estudos, conduzido em famílias finlandesas e usando marcadores específicos, estabeleceu uma ligação entre a SMF e três marcadores polimórficos no braço longo do cromossomo 15 (KAINULAINEN *et al.*, 1990). Outros autores, analisando quatro famílias americanas, confirmaram a ligação da SMF ao cromossomo 15, definindo a região cromossômica onde se encontra o gene da SMF em 15q15-q21.3 (DIETZ *et al.*, 1991b; TSIPOURAS *et al.*, 1991).

LEE *et al.* (1991) e MASLEN *et al.* (1991), através da técnica de Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizaram oligonucleotídeos para amplificar seqüências do gene da fibrilina a partir de bibliotecas de DNA complementar (cDNA), permitindo a caracterização parcial do gene da fibrilina e o seu mapeamento definitivo

para a região cromossômica 15q15-21. Este gene foi então denominado de FBN1 (LEE *et al.*, 1991).

A primeira mutação identificada de sentido trocado na região codificadora do gene FBN1 foi observada por DIETZ *et al.*, 1991a, o que resultou na prova definitiva de que este era o gene envolvido na SMF.

Ectopia Lentis (TSIPOURAS *et al.*, 1992), Síndrome de Shpritzzen-Goldberg (SOOD *et al.*, 1996), fenótipo MASS (DIETZ *et al.*, 1993) e aneurisma de aorta torácica familiar (MILEWICZ *et al.*, 1996) são outros exemplos de doenças nas quais também foram identificadas mutações no gene FBN1 e também afetam o tecido conjuntivo. Essas fibrilinoses, como são chamadas, apresentam combinações fenotípicas diferentes daquelas observadas na SMF.

WATSON *et al.* (1999) examinaram a distribuição e abundância das fibrilas 1 e 2 em biópsias retiradas tanto de pele da testa envelhecida pelo sol, como da pele do quadril protegida do sol. Através da técnica de hibridização *in situ*, os resultados revelaram diminuição do RNAm da fibrilina-1, mas níveis de RNAm da fibrilina-2 não alterados nas biópsias retiradas da testa. Um estudo imuno-histoquímico demonstrou que as microfibras da junção derme-epiderme estavam significativamente reduzidas nas biópsias com envelhecimento solar de moderado a severo, indicando que a fibrilina-1 pode contribuir para as características clínicas do envelhecimento da pele, como a formação de rugas e perda da elasticidade. Um estudo anterior a este (BERNSTEIN *et al.*, 1994) demonstrou níveis elevados de RNAm na elastina e fibrilina na pele envelhecida pelo sol.

As causas que levam a fibrilina-1 a originar diversas doenças com fenótipos relacionados ainda não são conhecidas (CHARBONNEAU *et al.*, 2004).

Em 2006, MAMADA *et al.* estudaram diferentes Single Nucleotide Polymorphisms – Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) dos exons 15, 43 e 55 do gene da FB1 de indivíduos com alta estatura e verificaram a ocorrência de polimorfismo no éxon 15, sugerindo que este SNP é um dos contribuidores para a alta estatura em indivíduos normais.

1.3.4. Estrutura da fibrilina-1

PEREIRA *et al.* (1993) completaram a caracterização do cDNA da fibrilina, elucidando a organização éxon/intron do gene e descobriram a origem do mapa físico do locus. A seqüência da pró-fibrilina codifica 2871 aminoácidos, os quais, excluindo o peptídeo sinal, está organizado em cinco regiões estruturalmente distintas. A maior dessas regiões, abrangendo 75% da proteína, possui 47 repetições homólogas ao fator de crescimento epidérmico (do inglês, EGF-like – *epidermal growth factor-like*), com módulos ricos em cisteína (Figura 3). Quarenta e três dessas repetições satisfazem o consenso para a ligação com o cálcio (do inglês, cbEGF – *calcium binding epidermal growth factor*), um evento que pode mediar interações proteína-proteína (HANDFORD *et al.*, 1990). Essa ligação modifica a estrutura da molécula de fibrilina levando à estabilização da mesma. Esta estabilização é essencial para o correto empacotamento lateral dos monômeros de fibrilina

durante a formação das microfibras, além de favorecer a interação entre microfibras e sua organização em macroagregados (KIELTY e SHUTTLEWORTH, 1993).

Na estrutura primária da fibrilina-1 há também módulos análogos àqueles encontrados na proteína LTBP (do inglês, *latent transforming growth factor binding protein* – fator de crescimento transformador latente ligado à proteína), chamados de módulos TB (Figura 3). Sua principal característica é a presença de 8 resíduos de cisteína que podem estar livres ou ligados por pontes dissulfídicas, cuja função pode estar associada à capacidade de adesão da fibrilina às células presentes na matriz extracelular (PEREIRA *et al.*, 1993). Sete dos módulos TB estão distribuídos entre os módulos cbEGF.

O quarto módulo TB da fibrilina-1 possui uma seqüência RGD (Arg-Gly-Asp) que se liga às integrinas para promover adesão celular (figura 3). As integrinas são receptores transmembrânicos presentes na superfície celular e podem interagir com proteínas da MEC, resultando na ancoragem destas. Já foram descritas interações entre a fibrilina-1 e a integrina alfa Vbeta3 por PFAFF *et al.*, em 1996 e SAKAMOTO *et al.* (1996).

Na proteína fibrilina-1, existem também os módulos FIB, que possuem oito resíduos de cisteína e características mistas, ou seja, parecem ser uma fusão dos módulos EGF e TB (Figura 3). Este módulo parece pertencer exclusivamente às fibrilinas (PEREIRA *et al.*, 1993).

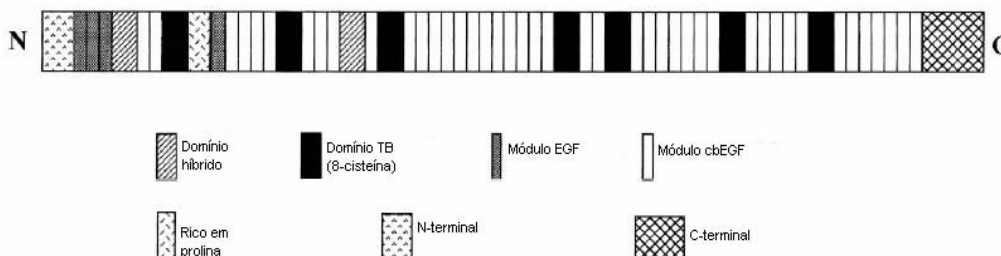


Figura 3: Estrutura do gene da fibrilina-1 (FBN1).
(Fonte: HANDFORD, 2000) modificado.

Quase todas as repetições EGF-like são codificadas por exons únicos; conseqüentemente, o gene da fibrilina-1 é relativamente grande e a seqüência codificante é altamente fragmentada.

BIERY *et al.*, em 1999, estimaram o tamanho do gene FBN1 em 200 quilobases (kb), divididas em 65 exons.

Os exons são regiões do gene que contêm o código para produzir a proteína do gene. Cada éxon codifica uma porção específica da proteína. Já os introns são seqüências do DNA que são inicialmente copiadas no RNA mas são retiradas do RNA transcrito final por “splicing”.

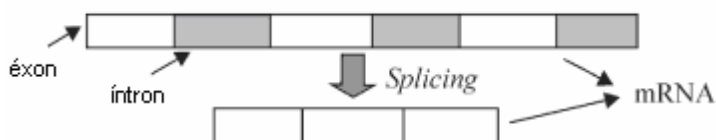


Figura 4: “Splicing” na molécula de mRNA. Fonte:www.scielo.br (modificado).

1.3.5. Mutações no gene FBN1

Por meios de estudos imuno-histoquímicos com anticorpos monoclonais contra a fibrilina foi demonstrado que a maioria dos pacientes com Síndrome de Marfan exibe anormalidades das microfibras na matriz extracelular (HOLLISTER *et al.*, 1990). Mas DIETZ *et al.*, (1991b) demonstraram uma mutação pontual no gene da fibrilina-1 em dois pacientes sem ligação com a Síndrome de Marfan. Mutações na fibrilina-1 são a causa de manifestações pleiotrópicas da Síndrome de Marfan que envolve principalmente os sistemas musculoesquelético, ocular e cardiovascular, sendo caracterizada por grande estatura, deformidades esqueléticas, deslocamento das lentes oculares e propensão para dissecção aórtica. A Síndrome de Marfan é uma doença hereditária sistêmica autossômica dominante do tecido conjuntivo, ocorrendo em todas as raças e grupos étnicos.

Pouco tempo depois, em 1992, HAYWARD *et al.*, encontraram uma determinada mutação duas vezes em 111 casos de SMF e outra mutação foi encontrada apenas uma vez em 140 indivíduos com SMF. Assim, puderam concluir que parece haver muitas mutações diferentes do FBN1 responsáveis pela SMF.

Em 1998, COLLOD-BÉROUD *et al.* relataram mais de 150 mutações no gene FBN1 e verificaram que elas estavam espalhadas pelo gene inteiro. A maioria delas eram mutações missense. As mutações missense, onde ocorre a substituição de um aminoácido por outro, ocorrem freqüentemente

em exons que codificam os domínios cbEGF (DIETZ *et al.*, 1992a; DIETZ *et al.*, 1992b). Estas mutações podem modificar a estrutura de um domínio de cbEGF através de alterações na formação de pontes dissulfídicas, afinidade de ligação ao cálcio e interações inter e intramoleculares (DOWNING *et al.*, 1996). As modificações nesses domínios comprometem a organização e função das microfibras.

A região central da molécula de fibrilina-1, que é codificada pelos exons 23 a 32, dá origem a uma variação desta síndrome, chamada SMF neonatal, que é caracterizada por uma forma severa e letal da SMF (KAINULAINEN *et al.*, 1994; TIECKE *et al.*, 2001).

PUTNAM *et al.* (1996) examinou 8 pacientes SMF neonatal e complicações cardiovasculares severas da SMF causadas por mutações nessa região do gene. Usando iniciadores intrônicos, os exons 23 a 32 do DNA genômico foram amplificados e seus fragmentos foram examinados por análise se Single Strand Conformation Polimorphysm, do inglês – Polimorfismo Conformacional de Cadeia Única (SSCP) e seqüenciados. Esta análise documentou mutações nos exons 25, 26 e 27 do gene da FBN1 em seis desses pacientes.

Os exons relacionados à SMF neonatal (23 a 32) têm sido os mais estudados e os que mais estão envolvidos com o fenótipo mais severo da SMF. Até o momento, diversas mutações distintas foram encontradas nesses exons. Segundo a “Universal Mutation Database” (UMD), em sua última atualização (COLLOD-BÉROUD *et al.*, 2003), foram relatados mais de 500 registros, dos quais a maioria se encontra nessa região.

PALZ *et al.*, em 2000, analisaram os exons 59 a 65 do gene em 124 pacientes com SMF e identificaram cinco mutações novas. Os seus achados, juntamente com os de COLLOD-BÉROUD *et al.* (1998), demonstraram que por volta de 40 % das mutações nesses exons estão associadas com o fenótipo brando caracterizado pela falta de patologia na raiz da aorta. Ao contrário, somente 7% das mutações relatadas nas outras partes do gene resultaram em um fenótipo brando sem patologia de aorta, mesmo quando a mutação ocorreu na mesma posição no domínio cbEGF. Os autores notaram que as observações sugeriram que a porção N-terminal, mas não a C-terminal é necessária para a incorporação nas microfibras poliméricas.

COLLOD *et al.* (1996) relataram em seu trabalho que os exons 4, 13, 39, 41 59 e 65 estavam diretamente relacionados com alterações teciduais epiteliais e tegumentares. Eles chegaram a esta conclusão através do estudo detalhado do DNA determinando, assim, a posição dos nucleotídeos, o número dos codons, a seqüência normal e mutante dos codons, a base envolvida na substituição, o nome das mutações, o aminoácido selvagem e mutante, a proteína dominante e os sistemas envolvidos na mutação.

DIETZ *et al.*, em 1993, encontraram uma deleção no éxon 4 da FBN1, criando um códon de parada neste éxon, o que sugeriu que a região amino terminal é crítica na montagem microfibrilar e, isoladamente, pode participar da forma dominante negativa desse monômero tipo selvagem.

1.3.6. Fibrilina-1, fibrilina-2 e fibrilina-3

Em 1991, LEE *et al.*, com trabalhos de clonagem, identificaram um segundo gene, semelhante ao FBN1, o qual eles denominaram FBN2, que foi mapeado no cromossomo 5q23-q31. Este gene possui uma ligação com uma doença de manifestação esquelética, semelhante à SMF, denominada Aracnodactilia Contratural Congênita - ACC (OMIM#12050). A AAC é caracterizada por escoliose severa, osteopenia generalizada, contraturas dos dedos e formato das orelhas anormal, dentre outras características. Complicações cardiovasculares e oculares da SMF não ocorrem na ACC.

A alta homologia entre as duas fibrilinas e a semelhança clínica da manifestação esquelética entre as duas síndromes, levou a uma hipótese de que as fibrilinas poderiam ter funções semelhantes em relação à fisiologia das microfibras (LEE *et al.*, 1991). Além disso, esta grande semelhança sugeriu que seus genes tenham evoluído de um gene ancestral comum. Com isso, LI *et al.* (1993) isolaram e mapearam os genes murinos Fbn1 e Fbn2, comparando as seqüências de cDNA destes genes. O resultado mostrou que as proteínas estavam estruturalmente relacionadas, possuindo alta homologia aos genes FBN1 e FBN2.

Tanto a fibrilina-1 quanto a fibrilina-2 possuem o mesmo tipo de distribuição nos tecidos, ou seja, as duas estão presentes nas microfibras associadas com a elastina, embora a fibrilina-2 esteja localizada preferencialmente na MEC de tecidos ricos em fibras elásticas (ZHANG *et al.*, 1994).

ZHANG *et al.*, 1995, estudaram a expressão da Fbn1 e Fbn2 durante a embriogênese do camundongo. Através de técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, os autores demonstraram que a fibrilina-2 é expressa em vários tecidos e células, incluindo mesênquima, epitélio, condrócitos, vasos e células musculares cardíacas. Já a fibrilina-1 é expressa predominantemente na aorta, ligamentos suspensórios do cristalino, pele e pulmão. Foi observado também que primeiro ocorre um acúmulo de transcritos de Fbn2 durante a fase que precede o início da elastogênese em tecidos como epitélios, mesênquima, tecido muscular, esquelético e pulmonar. Esses transcritos de Fbn2 decrescem após o início da diferenciação tecidual, enquanto a quantidade de transcritos de Fbn1 aumenta. A única exceção ocorre no sistema cardiovascular, onde transcritos de Fbn1 são detectados a partir do décimo dia embrionário e em maior intensidade do que os transcritos de Fbn2 (YIN *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995). Assim, foi sugerido que a expressão da fibrilina-2 direciona a formação das fibras elásticas durante a embriogênese, enquanto a fibrilina-1 fornece a maior função estrutural das microfibras (ZHANG *et al.*, 1995).

Nos tecidos ósseos, a fibrilina-2 parece ter uma função semelhante ao da fibrilina-1, sugerindo que as duas fibrilinas podem tanto ter funções semelhantes como funções únicas dependendo do tecido em que se encontram, mas estudos morfológicos e bioquímicos das fibrilinas ainda não puderam esclarecer o papel da contribuição destas duas moléculas na formação das microfibras e suas funções em tecidos específicos (CHARBONNEAU *et al.*, 2003).

A fibrilina-3 foi seqüenciada por NAGASE *et al.* em 2001 e divide mais de 60% de identidade dos aminoácidos com as fibrilinas 1 e 2. O gene FBN3 foi recentemente identificado e está localizado no cromossomo 19p13.3-p13.2 (CORSON *et al.*, 2004). É um candidato para a forma recessiva da Síndrome de Weill-Marchesani (OMIM#277600), uma doença do tecido conjuntivo caracterizada por baixa estatura, braquidactilia, contraturas nas articulações e defeitos nas lentes. A análise do genoma murino mostrou que, neste organismo, o gene da fibrilina-3 é parcial e não funcional (CORSON *et al.*, 2004). Segundo esses autores, é provável que a fibrilina-3 tenha sido interrompida e inativada devido a rearranjos cromossômicos e eventos de recombinação durante a evolução do camundongo.

Embora seja evidente que uma das principais funções da fibrilina seja a formação da estrutura microfibrilar através de um mecanismo complexo de montagem, a importância funcional das proteínas associadas ainda não foi totalmente esclarecida.

2 OBJETIVO

Avaliar, através da análise de seqüenciamento de DNA, a presença de polimorfismos nos exons 4, 13, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 39, 41, 59 e 65 do gene da fibrilina-1 em indivíduos portadores de hérnia inguinal.

3 MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Foram selecionados 120 pacientes para a investigação. Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas nos Serviços de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e no do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/HCFMUSP). Todos os participantes receberam orientações prévias sobre o caráter científico do estudo e manifestaram concordância em integrá-lo, através da assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme disposto no protocolo CAPPesq nº 550/03 (Anexo 1).

Para os indivíduos portadores de hérnia inguinal, foram excluídos os indivíduos que apresentavam diagnóstico prévio de qualquer outro tipo de hérnia, aneurisma, diverticulite, incontinência urinária ou qualquer outra doença difusa do tecido conjuntivo. Em relação aos indivíduos-controle, nenhum foi diagnosticado como portador de hérnia inguinal ou das outras doenças anteriormente citadas.

Estudou-se o DNA genômico de 120 indivíduos de ambos os sexos, distribuídos em dois grupos distintos, sendo:

Grupo A – Indivíduos portadores de hérnia inguinal

Grupo B – Indivíduos-controle

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração do DNA genômico

Foram colhidos 10 mililitros (mL) de sangue venoso periférico de cada indivíduo, com o auxílio de dois tubos a vácuo contendo 5 % de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O sangue foi então homogeneizado, as amostras foram identificadas e enviadas ao Laboratório de Anatomia Médico-Cirúrgica, LIM02, do HCFMUSP.

De cada amostra foi extraído o DNA genômico, conforme protocolo descrito por MILLER *et al.* (1988):

1. O sangue foi homogeneizado e colocado em um tubo de fundo cônico, completando-se até 50 mL com tampão de lise de hemácias e plaquetas “bloodlysis” (NH₄Cl 1550mM; KHCO₃ 100 mM; EDTA 10 mM; pH7,4). Os tubos foram agitados e deixados em banho de gelo por 30 minutos para romper a membrana das células contidas na amostra.
2. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1800 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuscendido em 10 mL do tampão “bloodlysis” e centrifugado novamente por 5 minutos a 1800 rpm.
3. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscendido em 3 mL de tampão de lise de núcleos de leucócitos “nucleolysis” (Tris-HCl 100mM; NaCl 4M; EDTA 20 mM; pH 8,2). Posteriormente foram adicionados 100 microlitros (μL) de proteinase K (concentração de 10 mg/mL) e 300 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%.

4. O material foi então encubado por aproximadamente 15 horas (“overnight”), em banho-Maria a 37°C, a fim de auxiliar a quebra dos núcleos das células e assim, expor o DNA. Após a incubação, foi acrescentado 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 6 M e o material foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm.

5. Após este procedimento, o DNA foi precipitado com etanol absoluto num tubo de vidro e obtido com o auxílio de um capilar. O DNA foi transferido para um microtubo de 2 mL, onde foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 400 µL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH8,0). O DNA foi então incubado por 30 minutos a 65° C e estocado em geladeira a 4-10 °C.

3.2.2. Determinação espectrofotométrica do DNA

Após a extração, alíquotas diluídas em 1:50 (1µL de DNA para 49 µL de água ultrapura) foram quantificadas através da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro Gênese 5 (Spectronic) , num comprimento de onda de 260 nm e 280 nm (DO260/DO280 nm). Esta razão fornece uma estimativa da pureza do DNA em relação à quantidade de proteínas, que varia entre 1,8 e 2,0. Também observa-se a concentração do DNA e das proteínas.

3.2.3. Determinação da qualidade do DNA por Eletroforese em gel de agarose

Para reforçar os resultados obtidos na espectrofotometria, foi utilizado um segundo meio que permite a visualização da concentração de DNA, a eletroforese em gel de agarose 2%, assim descrita:

1. Pesa-se 0,5 grama (g) de agarose num Erlenmeyer e mistura-se esta em 25 mL de tampão TBE (tris, ácido bórico e EDTA 0,5M ph8,0), concentrado.
2. Leva-se para aquecer por aproximadamente 1 minuto, homogeneizando-se aos poucos até a solução estar dissolvida por completo.
3. Logo em seguida, adiciona-se 2,5 μ L de brometo de etídeo e homogeneiza-se novamente.
4. Despeja-se a solução numa cuba de eletroforese e aguarda-se o esfriamento, até a solução se tornar um gel endurecido.

As amostras são posteriormente misturadas a um corante (bromofenol azul – “bromophenol blue”, sacarose e água ultrapura) e aplicadas no gel, o qual fica submerso em tampão TBE diluído. A cuba correrá a uma corrente constante de 80 Volts por aproximadamente 40 minutos.

Após o tempo de corrida, o gel é analisado sob luz ultravioleta a fim de visualizar a concentração de DNA.

3.2.4. Amplificação do DNA genômico pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene da FBN1 foi obtida através da PCR, utilizando-se iniciadores dos exons 4, 13, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 39, 41, 59 e 65, que compõe este gene humano (NIJBROEK *et al.*, 1995). Os iniciadores foram sintetizados comercialmente (Invitrogen do Brasil), utilizando-se oligonucleotídeos das extensões 5' e 3', segundo a descrição de NIJBROEK *et al.*, 1995 (Tabela 1) .

ÉXON	INICIADOR "SENSE"	INICIADOR "ANTISENSE"
4	AAC TCC TGT GAG CTG TTG C	GCT GTG TCC CAG GTA ATC G
13	TCC CCC AAA TAA AGC TAT TTC	TGA AAC TGC AAT GGA AGG AG
24	CAG CAA ATT ATT ATG TGT GCA G	ATC AAG TAG AGT GCT GAG ATC
25	CAA GAA CTT CCA ACC TTC ATG	TTA AAG GAC GTC CCC TCT C
26	AAT TAA GGC TGT CCT GAG AC	CAT GGA ATC CTT CTC TTT CTG
27	GGC CCC CAC CTT TAA CAT G	GAA AGT CTT TGC TCC TTA C
31	GTA CTC AAT GAT ATC AAA TAG C	ACC AAT CTC TTA ACT ACT TAA TA
32	CCA AAA GAC ATT TGT GCT GAG	GTG TAA TCT ATG CAG TCC TTG
39	ATT TAC AAT GCT AAA GGA ATG C	TCA GTT CTT GAT ATC TGC AAG
41	GCT TGT TGA GTA TCC ACT TAG	GCT TCC TTC GCT AAG ACT G
59	GCG TGT ACA CAT CAT TTT TAG	ATG TGT CAG GAG CTA GGT G
65	GAG CTA AGT GGC ATA TGT AC	TGT ACC TAT GAT ATG ATG ATT C

Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores dos exons estudados do gene da fibrilina-1. (Fonte: Nijbroek *et al.*, 1995, modificado)

Para cada reação de PCR, foi preparada a seguinte solução (25 µL) num microtubo em banho de gelo:

- 2,5 µL de solução tampão ou “Buffer” (Invitrogen do Brasil);
- 0,75 µL de cloreto de magnésio - MgCl₂ (Invitrogen do Brasil);
- 0,4 µL de desoxirribonucleotídeos (DNTPs), sendo: 4 µL dATP, 4 µL dCTP, 4 µL dTTP, 4 µL dGTP (Invitrogen do Brasil);
- 1 µL do iniciador “sense” (Invitrogen do Brasil);
- 1 µL do iniciador “antisense” (Invitrogen do Brasil);
- 0,3 µL da enzima Taq polimerase (DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*- Invitrogen do Brasil);
- 16,05 µL de água destilada ultrapura;
- 3,0 µL do DNA a ser examinado.

O microtubo contendo a mistura foi colocado no termociclador PTC 100 (MJ Research) com ciclos programados específicos para cada éxon, que foram padronizados para cada um dos diferentes iniciadores. (Tabelas 2, 3 e 4). Ao término dos ciclos, o termociclador resfriou-se e manteve-se a 4°C. A seguir, o produto da amplificação pela PCR foi armazenado em geladeira a 4-8°C.

TEMPETATURA (°C)	TEMPO (MIN)	NÚMERO DE CICLOS
95	5	1
94	0,5	
58	1	30
72	1	
72	10	1

Tabela 2- Dados da PCR para os exons 4, 24, 25, 26, 31, 32, 39, 41, 59, 65

TEMPETATURA (°C)	TEMPO (MIN)	NÚMERO DE CICLOS
95	5	1
94	0,5	
54	1	29
72	1,5	
72	10	1

Tabela 3 - Dados da PCR para o éxon 27

TEMPETATURA (°C)	TEMPO (MIN)	NÚMERO DE CICLOS
95	5	1
94	0,5	
56	1	35
72	1,5	
72	10	1

Tabela 4 - Dados da PCR para o éxon 13

O sucesso da amplificação do produto de PCR foi verificado através da técnica de Eletroforese em Gel de Agarose, anteriormente descrita no item 4.2.3., conforme verificado na Figura 5.

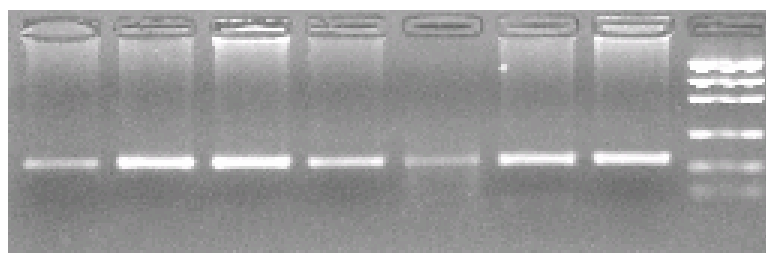


Figura 5: Foto da amplificação da PCR

3.2.5. Análise do polimorfismo do gene da fibrilina-1 pelo

Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)

Foram aplicados em gel de poliacrilamida a 10%, 5 μ L de produto de PCR amplificado e 5 μ L do corante bromofenol xileno cianol (“bromophenol blue”, xileno cianol, glicerol e água ultrapura) conforme o método descrito por ORITA *et al.* (1989). A corrida eletroforética foi realizada por sete horas em corrente constante de 550 V a 4°C no tampão TBE, para a detecção de alterações de um par de bases em um fragmento de DNA devido a mutações ou polimorfismos, através da alteração na mobilidade da fita simples de DNA.

Após a corrida, o gel foi corado através da técnica de coloração pelo nitrato de prata, sendo:

- Etanol 10% - oito minutos
- Ácido nítrico 1% - três minutos
- Nitrato de prata + formaldeído – 20 minutos
- Água ultrapura – três minutos
- Revelador (carbonato de sódio – Na_2CO_3 , água ultrapura) + formaldeído – até as bandas começarem a aparecer
- Solução de fixação (etanol, ácido acético e água ultrapura) – cinco minutos
- Água ultrapura

O gel foi então deixado secar ao ar ambiente e escaneado para posterior documentação.

Após a coloração e secagem do gel, as bandas presentes foram analisadas, comparando-se as bandas de indivíduos-controle com indivíduos portadores de hérnia inguinal. As amostras que demonstraram diferenças na posição das bandas foram submetidas à análise de seqüenciamento, para análise detalhada de sua composição.

3.2.6. Purificação dos produtos de PCR

Os indivíduos-controle e doentes que apresentaram padrões de bandeamento distintos foram purificados para uma posterior análise de seqüenciamento.

Para isso, foi realizada uma nova PCR, com produto final de 100 μL . Este foi novamente aplicado em gel de agarose para ser observado o sucesso da

amplificação e assim iniciou-se o processo de purificação, através de um “kit” comercial de purificação de DNA (“QIAquick PCR purification kit” – Qiagen). Foram adicionados 500 μL do tampão PB para 100 μL de produto de PCR num microtubo contendo uma coluna. Este foi centrifugado por um minuto a 13000 rpm para que o DNA fosse ligado. O sobrenadante foi descartado, a coluna foi colocada no mesmo microtubo, adicionou-se 750 μL do tampão PE para lavagem do DNA e centrifugou-se por um minuto a 13000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o microtubo foi centrifugado por mais um minuto adicional. A coluna foi então colocada num novo microtubo e foram adicionados 50 μL do tampão de eluição EB e o procedimento foi finalizado com uma nova centrifugação.

O material eluído foi novamente aplicado em gel de agarose a 2 % para confirmação do processo de purificação com o marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen do Brasil) e utilizado na reação de seqüenciamento (Figura 6).

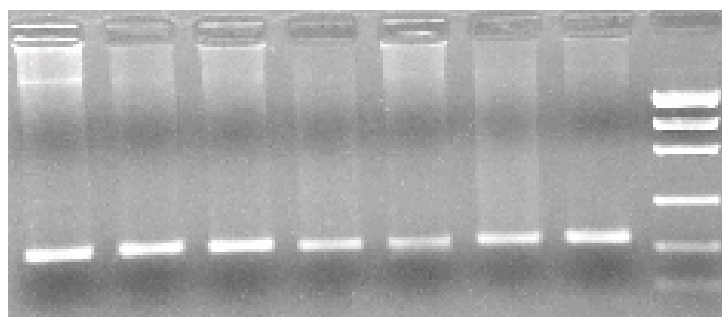


Figura 6 : foto dos produtos da PCR amplificados e purificados. Notar “Low DNA Mass Ladder” para comparação do peso molecular.

3.2.7. Seqüenciamento do gene da FBN1

As amostras purificadas foram posteriormente levadas ao Laboratório de Estudos do Projeto Genoma Humano da Universidade de São Paulo para serem seqüenciadas.

A reação de seqüenciamento foi realizada segundo a técnica descrita por SANGER *et al.* (1977), utilizando-se o “kit” comercial “Dyynamic ET Terminator kit” (GE Healthcare).

Para cada reação, foram utilizados aproximadamente 50-100 ng do DNA purificado do gene FBN1, 50 pmol dos iniciadores “sense” e “antisense” e 4 µL do “pré-mix” fornecido pelo fabricante, em um volume final de 15 µL. O seqüenciamento foi realizado em termociclador PTC-225 (MJ – Research), com 30 ciclos de 94° C por 20 segundos, 50° C por 15 segundos e 60 ° C por um minuto. Após a reação, o produto de seqüenciamento foi precipitado com 2 µg de acetato de sódio/EDTA e 80 µL de etanol absoluto, deixando-se em gelo por 30 minutos à velocidade máxima. O “pellet” obtido foi lavado com 100 µg de etanol 70%, deixando secar, e ressuspenso em 3 µL de tampão de carga que integra o “kit”.

O produto foi então aplicado em gel de seqüenciamento, procedendo-se à eletroforese no aparelho seqüenciador automático [MegaBACE 1000](#) (GE Healthcare).

3.2.8. Confrontação do genoma

Obtida a seqüência de bases nitrogenadas que compõem o DNA de cada uma das amostras analisadas, o resultado foi confrontado com o banco de dados disponibilizado pelo National Human Genome Research Institute (NHGRI), identificando-se eventuais mutações.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das freqüências genotípicas do gene FBN1 foi determinada para os indivíduos do estudo. Estes resultados foram analisados através do teste de Fisher-Freeman-Halton. O erro do tipo I foi limitado a 5% e o intervalo de confiança para o Risco Relativo foi calculado em 95%.

4 RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA FBN1 PELA TÉCNICA DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)

Os indivíduos com hérnia inguinal (grupo A), foram analisados para a verificação de mutações no gene da FBN1. Para tal, estes pacientes foram confrontados com indivíduos que não apresentavam hérnia inguinal (grupo B). O DNA genômico destes pacientes foi amplificado para os exons 4, 13, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 39, 41, 59 e 65 do gene da FBN1, sendo utilizados seus respectivos iniciadores (NIJBROEK *et al.*, 1995).

A presença de polimorfismo foi observada nos géis de poliacrilamida pela técnica de SSCP, comparando os grupos entre si. Quando foram observados padrões discrepantes de migração dos fragmentos de DNA no gel, o éxon foi considerado com alteração.

Nessa etapa foi observada diversidade do padrão de formação de bandas em diversos indivíduos dos grupos estudados (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Assim, a análise dos produtos de amplificação dos exons estudados do gene da FBN1 revelou bandeamento diferente do produto de amplificação entre os indivíduos com e sem hérnia inguinal. Diante deste fato, para confirmação da ocorrência de mutação, realizou-se o seqüenciamento do DNA nestes indivíduos.

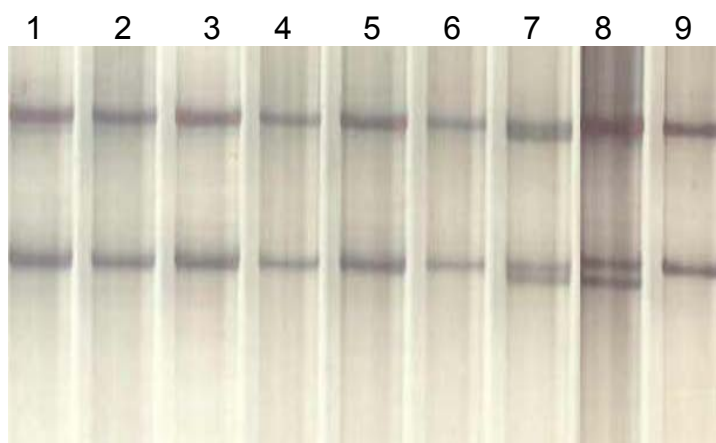


Figura 7 - Análise do polimorfismo do éxon 31 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos com hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 7 e 8.

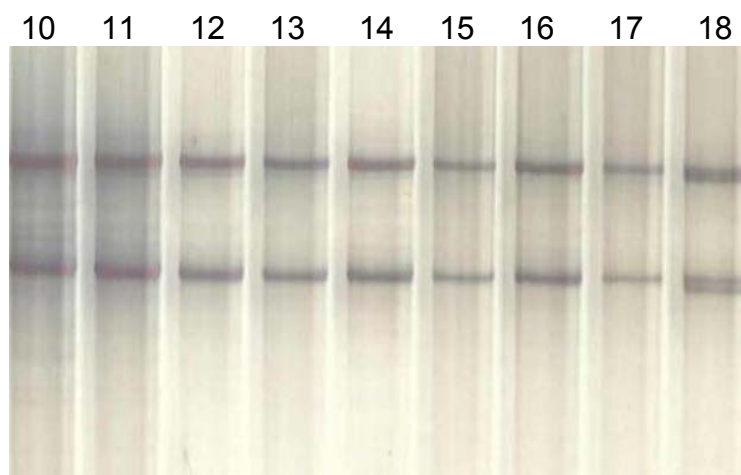


Figura 8 - Análise do polimorfismo do éxon 31 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos sem hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas no indivíduo 18.

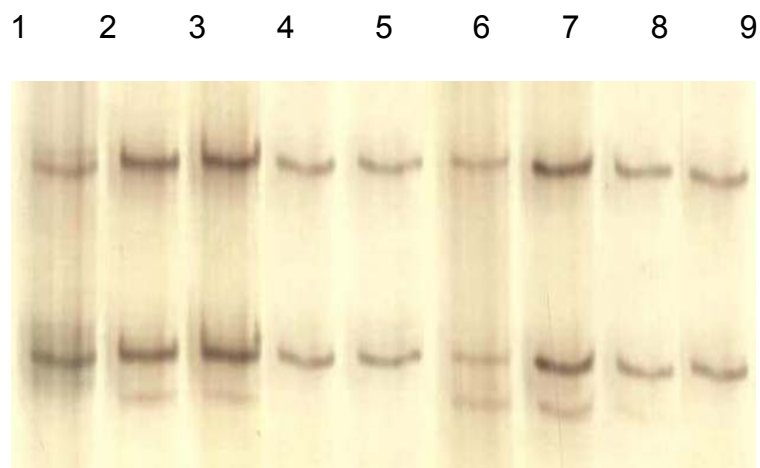


Figura 9 - Análise do polimorfismo do éxon 27 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos com hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 2, 3, 6, 7 e 8.

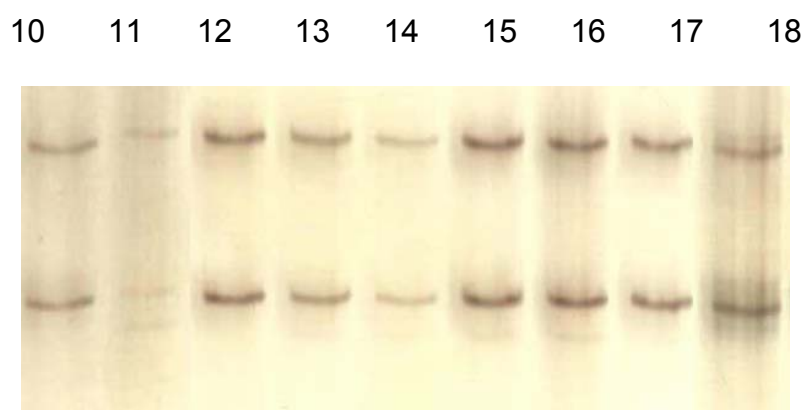


Figura 10 - Análise do polimorfismo do éxon 27 do gene FBN1 pelo polimorfismo conformacional de fita simples do grupo de indivíduos sem hérnia inguinal. Notar a diferença de bandas nos indivíduos 11, 15, e 16.

4.2. ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DO GENE DA FBN1

A análise do seqüenciamento dos indivíduos com bandejamento diferente foi confrontada com o banco de dados do NHGRI, o qual apresenta o seqüenciamento normal destes exons. Verificou-se que o gráfico de seqüenciamento dos exons 4, 13, 25, 26, 32, 39, 41, 59 e 65 não apresentou alteração, caracterizando ausência de mutação nestes exons. Para os exons 27 e 31, foi confirmada a presença de mutações, descritas a seguir:

1- **Éxon 27**: inserção de uma base adenina (A) entre os codons 1119 e 1120 (Figura 11), entre as bases 3357 e 3358, levando a uma mudança da seqüência original guanina-adenina-timina (GAT), que levou a uma alteração no códon para adenina-guanina-adenina (AGA), caracterizando a troca do aminoácido asparagina (asp) por arginina (arg).

A freqüência com que a mutação deste códon foi observada nos grupos estudados foi de 5 (8,3 %) dentre os 60 indivíduos doentes e 5 (8,3%) entre os 60 indivíduos do grupo controle (Tabela 5).

TTTTGCAGATATTGATGAGTGTTCAGAGA-GATCCTCTCCTA

|||||

TTTTGCAGATATTGATGAGTGTTCAGAGAAGATCCTCTCCTA

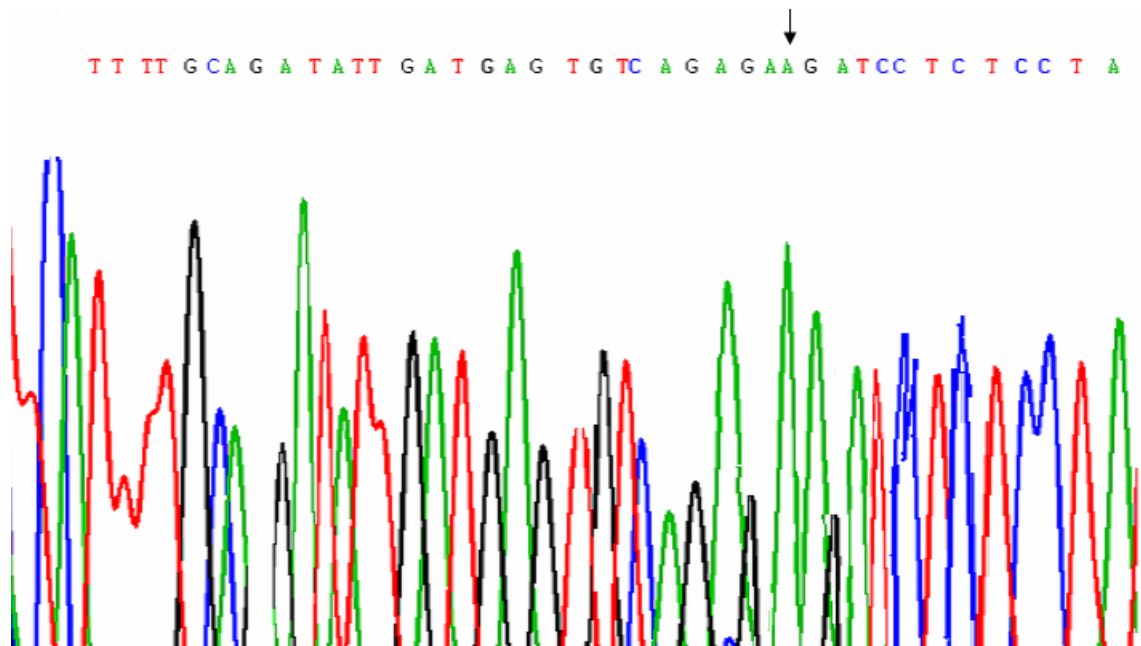


Figura 11 - Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de adenina (A) entre os codons 1119 e 1120, entre as bases 3357 e 3358, levando a uma mudança de seqüência - GAT→AGA (asp → arg).

2- **Éxon 27**: inserção de uma base citosina (C) entre os codons 1116 e 1117 (Figura 12), entre as bases 3348 e 3349, levando a uma mudança da seqüência original timina-guanina-timina (TGT), que levou a uma alteração no códon para citosina-timina-guanina (CTG), caracterizando a troca do aminoácido cisteína (cys) por leucina (leu).

A freqüência com que a mutação deste códon foi observada nos grupos estudados foi 8 (13,3%) dentre os 60 indivíduos doentes e 5 (8,3%) entre os 60 indivíduos do grupo controle (Tabela 6).

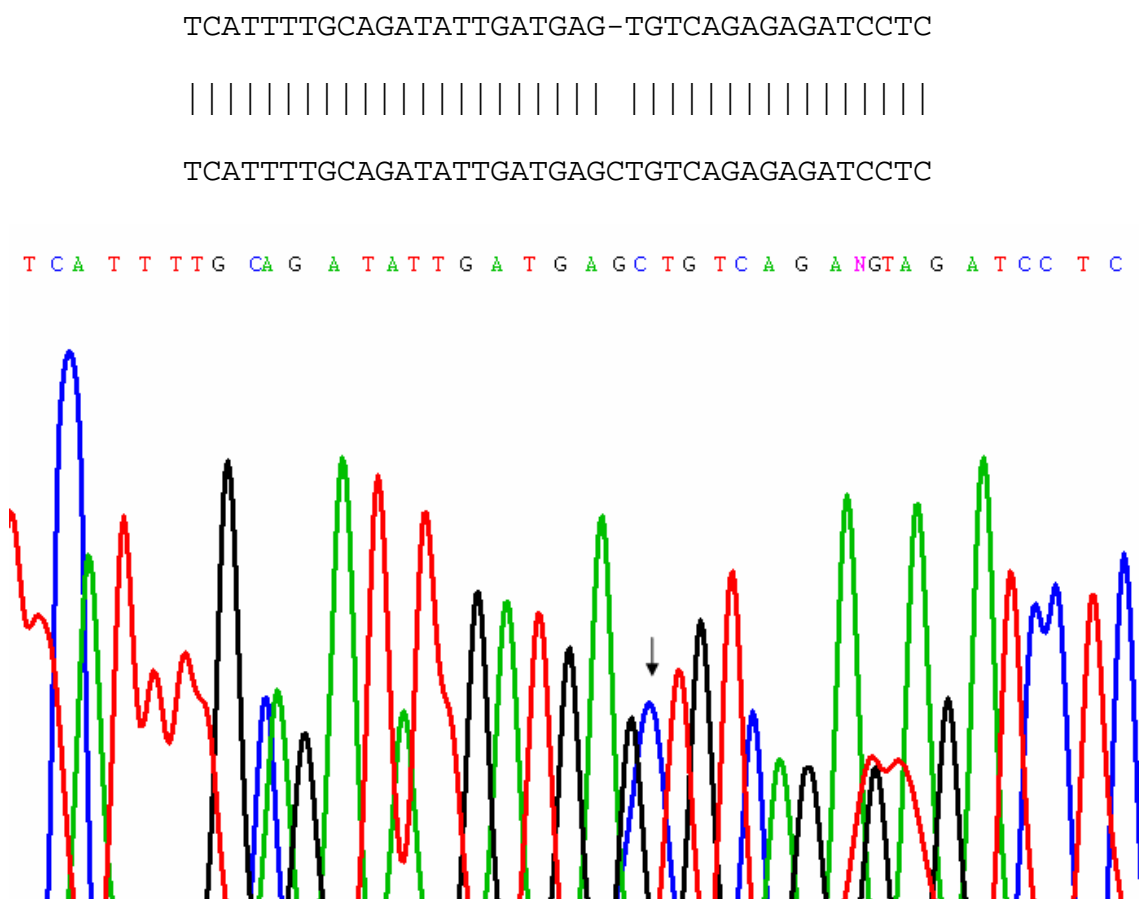


Figura 12 - Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de citosina (C) entre os codons 1116 e 1117, entre as bases 3348 e 3349, levando a uma mudança de seqüência - TGT→CTG (cys → leu).

3- **Éxon 27**: inserção de uma base guanina (G) no códon 1148, base 3443 (Figura 13), levando a uma mudança da seqüência original citosina-citosina-citosina (CCC), que levou a uma alteração no códon para citosina-guanina-citosina (CGC), caracterizando a troca do aminoácido prolina (pro) por arginina (arg).

A freqüência com que a mutação deste códon foi observada nos grupos estudados foi 3 (5%) dentre os 60 indivíduos doentes e 5 (8,3%) entre os 60 indivíduos do grupo controle (Tabela 7).

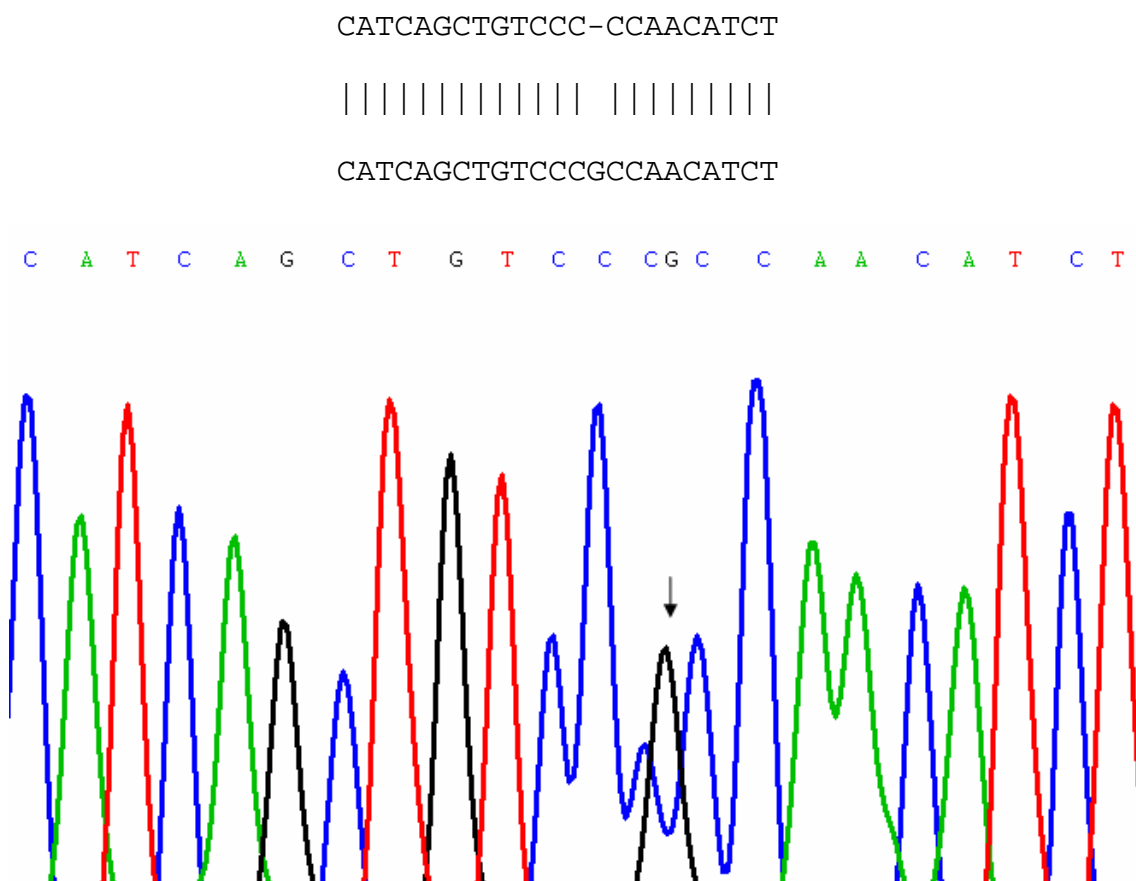


Figura 13 - Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 27 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de guanina (G) no códon 1148, base 3443, levando a uma mudança de seqüência - CCC→CGC (pro → arg).

4- **Éxon 31**: inserção de uma base citosina (C) entre os codons 1282 e 1283 (Figura 14), entre as bases 3846 e 3847, levando a uma mudança da seqüência original guanina-adenina-guanina (GAG), que levou a uma alteração no códon para citosina-guanina-adenina (CGA), caracterizando a troca do aminoácido glutamina (glu) por arginina (arg).

A freqüência com que a mutação deste códon foi observada nos grupos estudados foi de 3 (5%) entre os 60 indivíduos do grupo controle (Tabela 5).

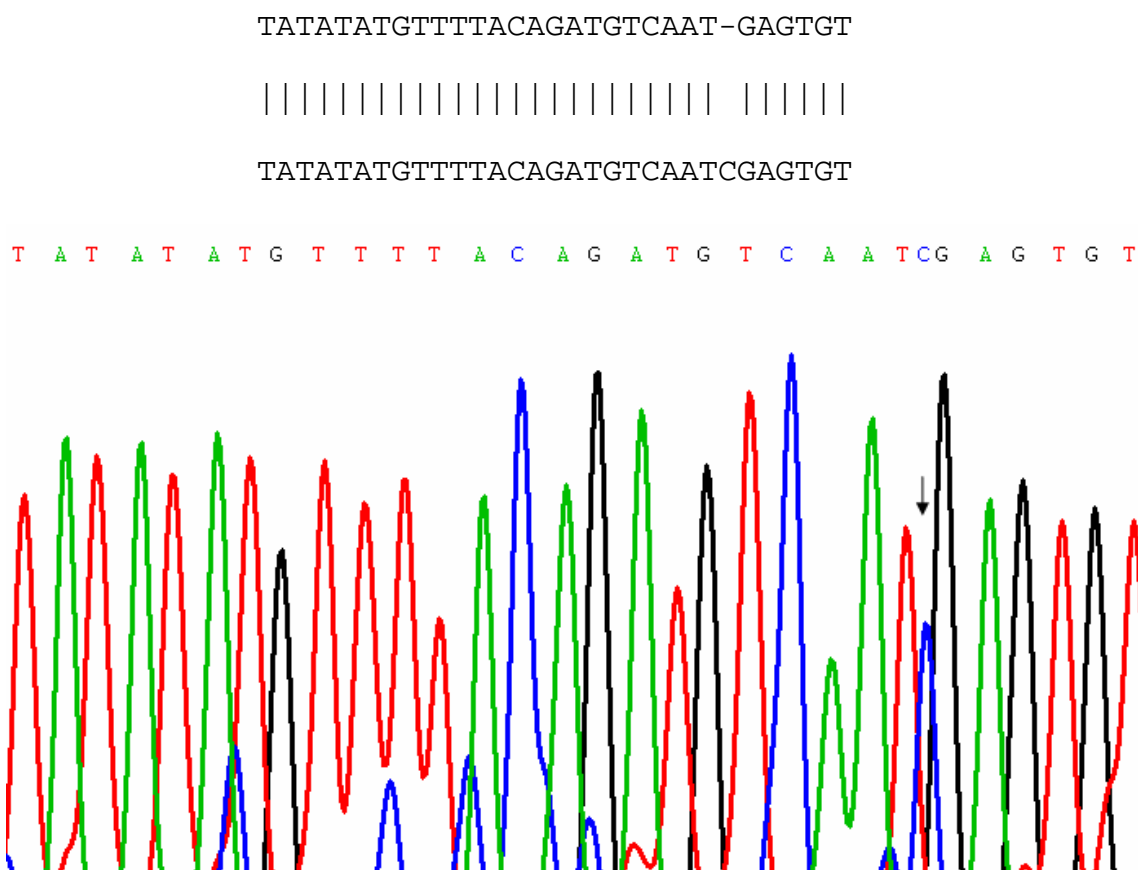


Figura 14 - Confrontação da seqüência do produto de amplificação do éxon 31 do gene da fibrilina-1 de paciente do estudo (linha inferior), em relação à seqüência registrada no banco de dados do NHGRI (linha superior). Notar a inserção de citosina (C) entre os codons 1282 e 1283, entre as bases 3846 e 3847, levando a uma mudança de seqüência - GAG→CGA (glu → arg).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo programa StatXact 4, versão 4.01. Para a análise da variável nominal polimorfismo, foi empregado o teste de Fisher-Freeman-Halton.

1- A análise dos dados pelo teste exato de Fisher-Freeman-Halton revelou que a associação da presença de mutação entre os codons 1119 e 1120 do éxon 27 com ocorrência de hérnia inguinal na população estudada não foi estatisticamente significativa (Tabela 5), não sendo possível a rejeição da hipótese de ocorrência ao acaso ($p= 1,0000$).

Tabela 5 – Distribuição da variável Mutação GAT → AGA entre os codons 1119 e 1120 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n= 120).

		Mutação		Total
		Ausente	Presente	
Grupo	Controle	55	5	60
	Hérnia	55	5	60
Total		110	10	120

2- A análise dos dados pelo teste exato de Fisher-Freeman-Halton entre os codons 1116/1117 do éxon 27 com ocorrência de hérnia inguinal na população estudada não foi estatisticamente significativa (Tabela 6), não sendo possível a rejeição da hipótese de ocorrência ao acaso ($p=0,5585$).

Tabela 6 – Distribuição da variável Mutação TGT → CTG entre os codons 1116/1117 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).

		Mutação		Total
		Ausente	Presente	
Grupo	Controle	55	5	60
	Hérnia	52	8	60
Total		107	13	120

3- A análise dos dados pelo teste exato de Fisher-Freeman-Halton revelou que a associação da presença de mutação no códon 1148 do éxon 27 com ocorrência de hérnia inguinal na população estudada não foi estatisticamente significativa (Tabela 7), não sendo possível a rejeição da hipótese de ocorrência ao acaso ($p= 0,7170$).

Tabela 7 – Distribuição da Mutação CCC → CGC no códon 1148 do éxon 27 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).

		Mutação		Total
		Ausente	Presente	
Grupo	Controle	55	5	60
	Hérnia	57	3	60
Total		112	8	120

4- A análise dos dados pelo teste exato de Fisher-Freeman-Halton revelou que a associação da presença de mutação entre os codons 1282/1283 do éxon 31 com ocorrência de hérnia inguinal na população estudada não foi estatisticamente significativa (Tabela 8), não sendo possível a rejeição da hipótese de ocorrência ao acaso ($p= 0,2437$).

Tabela 8 – Distribuição da variável Mutação GAG → CGA entre os codons 1282/1283 do éxon 31 do gene da fibrilina-1 segundo a presença de hérnia inguinal (n=120).

		Mutação		Total
		Ausente	Presente	
Grupo	Controle	57	3	60
	Hérnia	60	-	60
Total		117	3	120

5 DISCUSSÃO

Classicamente, as hérnias inguinais são consideradas o resultado de um processo multifatorial, juntamente com predisposições anatômicas e fatores dinâmicos. Além disso, fatores bioquímicos também possuem um papel importante na gênese da hérnia inguinal (PANS *et al.*, 2001)

A hérnia inguinal está entre as doenças que mais freqüentemente requerem cirurgia: seu reparo relata de 10 a 15% de todos os procedimentos cirúrgicos gerais (LICHTENSTEIN *et al.*, 1993).

Se a hérnia inguinal está relacionada a defeitos genéticos que envolvem a síntese do colágeno e fibras elásticas, então por que a HI ocorre em grande parte nos indivíduos idosos do que nos jovens? O porquê da ocorrência da HI ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que a HI não se dá especialmente a um único fator, e sim, a um conjunto deles como características anatômicas e outras doenças (obesidade, doença pulmonar obstrutiva crônica, constipação). As pesquisas também objetivaram o papel de fatores genéticos como possíveis alterações no metabolismo do tecido conjuntivo (BELLÓN *et al.*, 2001). Essa idéia também é apoiada pelo fato de doenças como as Síndromes de Marfan e Ehlers-Danlos, *cutis laxa*, *osteogenesis imperfecta* (UITTO *et al.*, 1989) e desarticulação congênita do quadril (UDEN *et al.*, 1988) estarem associadas com processos herniários, bem como o padrão de expressão de determinados tipos de colágeno (WAGH *et al.*, 1974) e certas disfunções enzimáticas (READ *et al.*, 1992). A doença herniária também pode acompanhar casos de Síndrome de Williams,

caracterizada por defeitos no gene da elastina (MORRIS *et al.*, 1988) e Marfan, caracterizada por defeitos no gene da fibrilina-1 (MONTGOMERY *et al.*, 1988).

A etiologia da hérnia inguinal em adultos é multifatorial. Elas emergem no orifício miopectíneo de Fruchaud, uma abertura na parede abdominal mais baixa, originada da falta de uma camada mioaponeurótica, a qual é fechada somente pela fáscia transversal. As características anatômicas comuns entre todas as hérnias da virilha não respondem a pergunta: por que menos de 5% dos seres humanos desenvolvem hérnia inguinal? Pergunta-se também: quais fatores predisõem a insuficiência da FT?

Como a FT é constituída em grande parte pela matriz extracelular e lembrando que a FT é estruturalmente dependente das fibras elásticas e do colágeno, organizadas numa estrutura para suportar forças de tensão, então qualquer alteração da matriz extracelular que promova perda na resistência e elasticidade no orifício miopectíneo, pode explicar como a hérnia inguinal se desenvolve (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2002).

O tecido conjuntivo é o mais abundante no organismo, sob variadas apresentações nos ossos, tendões, cartilagens e fáscias, conferindo forma e rigidez estrutural ao corpo.

A degradação tecidual depende da atividade de proteinases secretadas pelas células do próprio tecido conjuntivo. O equilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular é importante para a integridade tecidual, pois sua remodelação ocorre continuamente (JACKSON *et al.*, 1996).

A MEC propicia a rede arquitetural para os tecidos, dando propriedades físicas específicas necessárias para a integridade tecidual, bem como informações de posicionamento requeridas pelas células. Ao mesmo tempo, a rede arquitetural serve para situar, concentrar e seqüestrar complexos fatores de crescimento. São principalmente os fibroblastos que produzem colágeno, elastina e fibrilina (CHARBONNEAU *et al.*, 2004). Estas células encontram-se embebidas nessa matriz viscoelástica e correspondem somente a 20% do volume tecidual, mas secretam as proteínas e polissacarídeos necessários à manutenção do mesmo (GOEPEL *et al.*, 2003).

Dentre as proteínas fibrosas que determinam as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo, o colágeno é o principal elemento, perfazendo mais de 25% do total de proteína do organismo (PEACOCK, 1974).

Há mais de vinte tipos de colágenos geneticamente distintos no homem, formados a partir de informações distribuídas em genes de, pelo menos, 15 cromossomos (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2001). Em tecidos moles, os tipos I e III formam as fibras responsáveis por sua força tênsil; tendões e fâscias contém predominantemente colágeno tipo I, que é mais resistente (MÄKINEN *et al.*, 1987).

Diversos estudos em relação ao colágeno já foram descritos até hoje, mostrando sua alteração na hérnia inguinal. WAGH e READ (1971) demonstraram redução significativa de colágeno na bainha do músculo reto do abdome de pacientes com hérnia inguinal. PANS *et al.* (2001)

demonstraram redução do conteúdo de colágeno na FT com o envelhecimento. Este dado está de acordo com estudos de UITTO *et al.* (1989) na pele e de RODRIGUES *et al.* (1996) no músculo diafragma. Diversos estudos em relação à MMP também foram relatados (BELLÓN *et al.*, 1997; KLINGE *et al.*, 1999a; KLINGE *et al.*, 1999b, ROSCH *et al.*, 2002; ABCI *et al.*, 2005). A MMP está relacionada com a clivagem do colágeno, resultando na síntese modificada ou defeituosa deste.

Recentemente verificou-se que alguns anos após a cirurgia de hérnia inguinal, os pacientes fumantes estavam mais dispostos à recorrência de hérnia inguinal do que os não fumantes. Mas ainda não está claro se o fumo predispõe a formação da hérnia inguinal (JUNGE *et al.*, 2006).

As propriedades elásticas, bem como as de resistência do tecido conjuntivo são determinadas pelas fibras elásticas. Estas constituem um componente microfibrilar, predominantemente periférico, constituído principalmente pela proteína fibrilina, e outro amorfo, constituído pela proteína elastina, que representa 90% da fibra madura (TASSABEHJI *et al.*, 1997).

Estudando os componentes das fibras elásticas da FT, RODRIGUES JUNIOR *et al.* (1990) e QUINTAS *et al.* (2000) demonstraram correlação entre quantidade de fibras elásticas e envelhecimento. Observaram uma redução significativa de fibras oxitalânicas, formadas apenas por microfibrilas, e aumento progressivo de fibras elásticas maduras com o envelhecimento.

A hipótese de que o sistema de fibras elásticas sofre alterações com o envelhecimento foi também aceita quando da demonstração da existência de correlação entre o envelhecimento e a presença de alterações estruturais e quantitativas do sistema de fibras elásticas em outros tecidos como na cápsula esplênica (RODRIGUES *et al.*, 1999), no músculo diafragma (RODRIGUES E RODRIGUES JUNIOR, 2000) e no ligamento interespinhoso (BARROS *et al.*, 2002). Estes estudos demonstraram também a presença de degeneração de fibras elásticas maduras e redução de fibras oxitalânicas.

YOO (2003) descreveu duas mutações pontuais no éxon 20 do gene da elastina em indivíduos do sexo masculino com hérnia inguinal. Essas alterações podem contribuir para o enfraquecimento tecidual e o desenvolvimento da hérnia inguinal. Recentemente, RODRIGUES *et al.* (2006) analisaram o éxon 20 do gene da elastina em 49 pacientes com hérnia inguinal e 75 pacientes-controle, encontrando uma associação estatisticamente significativa (Odds Ratio 49,93) entre a mutação g28197A>G e a hérnia inguinal.

POMPEU (2004), estudando mulheres com incontinência urinária de esforço, observou, também no éxon 20 do gene da elastina, a mesma mutação no códon 422 (AGT → GGT). Porém, essa mutação foi observada em igual proporção nas pacientes e nos controles, sugerindo ser um polimorfismo de nucleotídeo único na população.

Também no gene da elastina e também no códon 422, a troca de serina (AGT) por glicina (GGT) foi descrita por RICCI JUNIOR em 2004 em

pacientes com doença diverticular dos cólons. Esta mutação não foi observada nos casos controles. O autor conclui que esta mutação encontrada nos pacientes portadores de doença diverticular, relacionada a porção hidrofóbica da elastina, pode promover a perda da complacência da parede intestinal e o desenvolvimento do divertículo.

A elastina é sintetizada principalmente em tecidos em desenvolvimento, com produção restrita em adultos, e para que exerçam sua função por toda a vida do indivíduo, as fibras elásticas precisam ter tamanho e orientação espacial adequados, dispendo-se em rede, integradas às fibras colágenas. Esta disposição arquitetural é que mantém a resistência tecidual normal, permitindo o retorno do tecido à sua forma original após ser submetido a situações de esforço mecânico (ROSENBLOOM *et al.*, 1993).

Podem ser identificados três tipos de fibras elásticas à microscopia. As fibras oxitalânicas, que têm função de resistência e são constituídas por microfibras de 8 -12 nm de comprimento, possuem um aspecto de “colar de contas” e são dispostas em feixes paralelos. Estes feixes de microfibras formam um arcabouço para a deposição de tropoelastina durante a fibrilogênese elástica (SHERRATT, 2001). Sabe-se que, pelo menos, oito proteínas diferentes fazem parte da estrutura das microfibras, sendo a fibrilina-1 a principal delas. As fibras elaunínicas, que são caracterizadas por um arcabouço microfibrilar com deposição de pequena quantidade de elastina. E as fibras elásticas maduras, que exibem maior deposição de elastina. Tanto as fibras elaunínicas como as fibras elásticas maduras são

responsáveis pela distensibilidade reversível dos tecidos (ROSS *et al.*, 1973).

A fibrilina-1, uma glicoproteína ligante do cálcio rica em cisteína, é o principal componente das microfibras extracelulares. Ela é organizada em fibras multiméricas compostas de dezenas ou talvez centenas de monômeros (HANDFORD *et al.*, 2000).

A fibrilina-1 é codificada pelo gene FBN1 e sua principal característica estrutural é a presença de módulos ricos em cisteína, homólogos aos encontrados no fator de crescimento epidérmico (EGF). A fibrilina-1 é composta por 47 módulos EGF, sendo que 43 são do subtipo que se liga ao cálcio (cbEGF) (PEREIRA *et al.*, 1993). Os fatores de crescimento são moléculas especializadas na comunicação intercelular. Eles controlam a proliferação celular, diferenciação e síntese de remodelamento da matriz. A MEC fornece uma base estrutural para a multicelularidade, enquanto os fatores de crescimento tornam possível a transferência de informação requerida para a construção de complexas estruturas celulares. A principal característica dos módulos cbEGF é a presença de regiões consenso para a ligação ao cálcio. Esta ligação modifica a estrutura da molécula de fibrilina levando à estabilização da mesma. Esta estabilização é essencial para o correto empacotamento lateral dos monômeros de fibrilina durante a formação das microfibras, além de favorecer a interação entre microfibras e sua organização em macroagregados (KIELTY e SHUTTLEWORTH, 1993). Tendo em vista a preponderância do módulo cbEGF, fica evidente que ele deve desempenhar um papel muito importante na proteína. Na verdade, na

ausência de cálcio, a morfologia das microfibrilas torna-se difusa e indefinida. Ligações com cálcio protegem a fibrilina-1 contra degradação proteolítica, enfatizando a importância deste na integridade estrutural dessa molécula (HANDFORD, 2000).

A fibrilina-1 foi isolada de culturas de fibroblastos humanos, caracterizada e batizada por SAKAI *et al.*, em 1986. Possui uma vasta distribuição no tecido conjuntivo da pele, pulmões, rins, vasos, cartilagem, tendões, músculos, córnea e zônula ciliar. Pode estar associada à elastina ou não. Seu peso molecular é de 350 kDa, sendo que ela contém aproximadamente 14% de cisteína e, conseqüentemente, ligações dissulfídicas intra e inter-cadeias (SAKAI *et al.*, 1986). Os monômeros de fibrilina são sintetizados por várias células da matriz extracelular, incluindo fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso e pericondrócitos. A proteína inicial tem uma seqüência que serve como molde e um propeptídeo que são clivados antes que ocorra a montagem das microfibras fora da célula. Estudos em invertebrados demonstraram que a estrutura e função da fibrilina vêm sendo conservadas ao longo da evolução (SHERRATT *et al.*, 2001).

As fibrilinas desenvolvem papéis variados na matriz extracelular. Dentre tantas, a principal função da fibrilina-1 é na homeostase do tecido conjuntivo, mantendo a integridade das microfibras e, conseqüentemente, mantendo as propriedades das fibras elásticas durante a vida pós-natal, enquanto que a fibrilina-2 está envolvida na formação da fibra elástica durante o desenvolvimento embrionário (PEREIRA *et al.*, 1997; PEREIRA *et*

al., 1999). Já o papel da fibrilina-3 ainda não está totalmente esclarecido (CORSON *et al.*, 2004).

Em relação à fibrilina-1 a porção N-terminal é uma seqüência rica em prolina (pro) que pode atuar como uma 'dobradiça'; a fibrilina-2 tem uma seqüência rica em glicina (gly) e a fibrilina-3, uma seqüência rica em pro e gly. As ligações cruzadas da transglutaminase entre peptídeos de fibrilina foram identificadas e provavelmente influenciam a estabilidade e elasticidade. A fibrilina-1 e a fibrilina-2 têm padrões de expressão distintos, mas sobrepostos, com a fibrilina-2 geralmente expressa mais cedo no desenvolvimento do que a fibrilina-1. É provável que as microfibras em alguns tecidos possam ser montadas de diferentes isoformas de fibrilinas. O objetivo maior das microfibras é a retração e a extensão (KIELTY *et al.*, 2002).

Na pele, as microfibras são o principal constituinte das fibras oxitalânicas, que se estendem perpendicularmente da epiderme à derme papilar (SHERRATT *et al.*, 2001). Há estudos que relacionam as fibrilinas 1 e 2 com o envelhecimento da pele (WATSON *et al.*, 1999; BERNSTEIN, 1994).

Recentemente foi realizado um estudo com indivíduos de alta estatura e houve a ocorrência de um polimorfismo no éxon 15 da FBN1, sugerindo que este éxon está relacionado à alta estatura de indivíduos normais (MAMADA *et al.*, 2006).

Existem muitas doenças hereditárias que apresentam alterações no tecido conjuntivo, as quais provavelmente resultam de um componente

anormal da matriz extracelular. As mutações no gene da fibrilina-1 (FBN1) causam principalmente a síndrome de Marfan, uma doença autossômica dominante do tecido conjuntivo, com alto grau de variabilidade clínica e manifestações nos sistemas músculo-esquelético, ocular e cardiovascular. (ROBINSON e GODFREY, 2000).

Mais de 500 mutações no FBN1 já foram descritas, principalmente na SMF. O tipo de mutação mais freqüentemente encontrada é a “missense” (troca de sentido) que resulta na síntese de uma fibrilina defeituosa, mas capaz de formar um polímero. A proteína mutada se liga às fibrilinas normais; isto potencialmente retarda ou previne a secreção de ambas, porém certamente interferem na formação de agregados microfibrilares e deposição da fibrilina na matriz extracelular (efeito dominante negativo). As mutações “nonsense”, que são causadas por codons prematuros de terminação, reduzem a expressão do alelo mutante. O resultado deste processo é a formação de uma proteína incompleta (COLLOD-BÉROUD *et al.*, 2003). De acordo com LIU *et al.* (1997), a maioria das mutações identificadas até o momento são “missense” (72%), das quais grande parte afetam os módulos cbEGF (53%).

Não há conhecimento de outro trabalho sobre o tema e, sabendo-se que o gene FBN1 é constituído por 65 exons (BIERY *et al.*, 1999), poderíamos ter optado por qualquer deles para iniciar a pesquisa. Entretanto, COOPER (2002) relata que 47% das mutações que causam doenças genéticas em humanos ocorrem por substituição de aminoácidos, o que afeta a estrutura protéica e induz alteração funcional. Sob o aspecto de

potencial comprometimento funcional da FBN1, dentre os exons de maior interesse para a pesquisa de mutação, podemos destacar 12 dos 65 exons: 4, 13, 39, 41, 59 e 65, que estão diretamente relacionados às mutações teciduais epiteliais e tegumentares (COLLOD *et al.*, 1996) e os exons 24, 25, 26, 27, 31 e 32 que, segundo os dados das mutações na SMF publicados até agora mostram a existência de um “hot spot” para a SMF neonatal (COLLOD-BÉROUD *et al.*, 2003).

MERKEL (2006) estudou uma linhagem de camundongos nocaute para a fibrilina, denominada $Fbn1^{null}$ e demonstrou que a fibrilina é indispensável para a vida pós-natal, pois os animais homozigotos morreram entre as duas primeiras semanas de vida devido a um colapso vascular. Já os animais heterozigotos tiveram uma sobrevivência normal, indicando que a haploinsuficiência de fibrilina-1 é compatível com a vida normal, embora esses animais também tenham alterações no sistema vascular e pulmonar. Portanto, a quantidade de fibrilina-1 presente na matriz extracelular parece ser um dos fatores responsáveis pela biodisponibilidade do fator de crescimento em condições normais. PEREIRA *et al.*, 1997 e PEREIRA *et al.*, 1999, também estudando animais nocaute para a SMF, já haviam demonstrado que a perda de fibrilina pode resultar em aneurisma e dissecação aórtica.

A chamada região neonatal nos exons 24-32 da porção central do gene FBN1 compreende uma das poucas correlações genótipo-fenótipo descritas geralmente aceitas (TIECKE *et al.*, 2001).

TYNAN *et al.* (1993), estudaram 65 indivíduos portadores de SMF neonatal, 29 indivíduos com fenótipos relacionados à SMF e 84 controles e verificaram cinco mutações novas, dentre elas, uma troca da base citosina (C) por guanina (G) no códon 1148, base 3442 do éxon 27 resultando na substituição de uma alanina por uma prolina. Esta transversão foi encontrada em três indivíduos com SMF e dois com aneurisma da aorta ascendente. Também foi relatada a mesma mutação em oito parentes de primeiro grau não afetados.

DIETZ *et al.*, em 1995, relataram a mesma mutação em um indivíduo portador de SMF branda, como também em membros de sua família sem SMF relatada.

Em 1997, SCHRIJVER *et al.* estudaram 55 indivíduos com SMF, 54 com aneurisma de aorta (AA), e 24 com outras doenças do tecido conjuntivo. Quatro destes indivíduos apresentaram a mutação, dois com SMF, um com AA e um com uma doença do tecido conjuntivo não definida. Um indivíduo do grupo com SMF era caucasiano e o outro era latino-americano; o indivíduo com aa era filipino e o outro era filipino-caucasiano. Dos 416 controles, 16 apresentaram a mutação. Destes 16, oito tinham descendência asiática e cinco, descendência latino-americana.

Com estes achados, todos os autores sugerem que esta mutação pode ser considerada potencialmente predisposta para um fenótipo que inclui aneurisma da aorta, tanto em indivíduos portadores de SMF ou não.

WATANABE *et al.* (1997) estudaram três pacientes japoneses com a Síndrome Shprintzen-Goldberg (SSG) e encontraram a mesma mutação. Um

era homozigoto, o outro heterozigoto para a mutação P1148A e o terceiro era homozigoto para o alelo tipo selvagem. Esta mutação também foi relatada posteriormente num estudo de 161 japoneses nativos sem SGS ou SMF. Onze eram homozigotos e 49 eram heterozigotos para a mutação. Também em 1997, WANG *et al.* identificaram cinco indivíduos com esta mutação numa população heterogênea. Desses cinco, não havia nenhum Caucasiano ou Afro-americano e três indivíduos eram Japoneses. Eles também verificaram que oito dos 25 indivíduos Chineses eram heterozigotos para essa mutação e nenhum homozigoto. Assim, WATANABE *et al.* (1997) concluíram que a mutação P1148A pode ser considerada como uma variante polimórfica com frequência aumentada na população asiática do que uma mutação causadora de doença e parece não predispor a SMF ou SSG, embora não se possa descartar o mecanismo que leve a essas doenças.

No presente estudo houve uma inserção de G neste mesmo códon, na base 3443. A mutação neste códon foi verificada em oito casos, três portadores de hérnia inguinal, e cinco controles. Dos cinco pacientes-controle, três são do sexo feminino e as três são de descendência asiática. Embora a raça dos indivíduos estudados não tenha sido um fator relevante para a presente pesquisa, comparando este estudo com outros citados anteriormente, este resultado não deve ser ignorado.

SCHRIJVER *et al.* (2002) estudaram 34 indivíduos com SMF e identificaram uma deleção de uma guanina (G) entre os codons 1119 e 1120 (éxon 27), base 3355. A mutação, ao contrário da mutação relatada

anteriormente, não foi identificada como predisponível para um determinado fenótipo encontrado na SMF ou fibrilinoses, mas sim, foi somente mais uma mutação relacionada a esse fenótipo. O presente trabalho verificou uma inserção de uma adenina (A) nesse mesmo códon, mas entre as bases 3357/3358 em 10 casos, cinco com hérnia inguinal e cinco controles.

Uma terceira mutação no éxon 27, caracterizada pela inserção de uma base C entre os codons 1116 e 1117 também foi verificada no presente trabalho em 13 casos, sendo oito com hérnia inguinal e cinco controles. Na literatura, não existem mutações relacionadas a estes codons até o presente momento.

Todas as diferentes mutações encontradas no presente trabalho situam-se nos domínios de ligação ao cálcio. Embora o resultado não tenha sido o esperado, deve-se lembrar que, essas mutações podem introduzir ou substituir resíduos de cisteína potencialmente implicados nas pontes dissulfeto. Mutações nesse domínio (cbEFG) geralmente resultam em um atraso na secreção ou na retenção intracelular de profibrilina-1. Como três pontes dissulfeto são necessárias para manter o domínio nativo cbEGF, a supressão ou adição de resíduos de cisteína resultaria numa quebra desse domínio, o que implicaria num “trânsito”, diminuindo e desestabilizando a conexão entre os dois próximos domínios cbEGF (COLLOD-BEROUD *et al.*, 2003), tornando a morfologia das microfibras difusa e indefinida (HANDFORD *et al.*, 2000).

Já a única mutação encontrada no éxon 31 não ocorreu em nenhum paciente portador de hérnia inguinal, mas sim nos pacientes-controle e todos

com idades acima de 55 anos. Não há nenhuma mutação relacionada a ela até o presente momento na literatura mas, como esta mutação ocorreu somente em indivíduos sem hérnia inguinal, com idade avançada, pode-se levar em consideração o papel da fibrilina-1 em relação ao envelhecimento.

Diversos introns do gene FBN1 apresentaram mutações distintas (MÁTYÁS *et al.*, 2002), embora até hoje não tenha sido descrito o papel destas mutações. Mutações no íntron 24 também foram verificadas no presente estudo em cinco indivíduos: quatro homens doentes e um homem pertencente ao grupo controle. Apesar dos introns não serem regiões codificadoras de proteínas, estes podem alterar a taxa de transcrição do DNA e o processamento e estabilização do mRNA, resultando em alteração da síntese protéica (ROMERO *et al.*, 2002). Estas mutações em indivíduos acima de 55 anos também foram encontradas no éxon 31, talvez indicando polimorfismos encontrados na população geral.

Por razões que ainda não são completamente entendidas, as mutações são encontradas somente na minoria dos pacientes portadores de SMF. Um dos fatores discutidos é em relação ao tamanho do gene (200 kb) e alto número de exons (65) (ROBINSON e GODFREY, 2000).

De acordo com COLLOD-BEROUD *et al.* (2003) há poucas mutações ocorridas envolvendo a mesma base de um determinado códon. É possível que as diferentes mutações encontradas contribuam para a gênese da hérnia inguinal decorrente de mutação em outro éxon, já que o gene FBN1 é muito extenso e bastante ramificado.

6 CONCLUSÃO

Foram encontradas mutações distintas nos exons 27 e 31 e íntron 24 do gene FBN1 em pacientes e controles, não havendo associações estatisticamente significantes.

Devido a complexidade do tema como foi evidenciado na literatura, o estudo das alterações no gene da fibrilina-1 juntamente com alterações no gene da elastina, podem ser de grande contribuição para estudos futuros sobre a hérnia inguinal.

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE DA FIBRILINA-1 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HÉRNIA INGUINAL ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DE DNA.

1. PESQUISADOR: Profa. Dra CONSUELO JUNQUEIRA RODRIGUES

CARGO/FUNÇÃO: Professora Associada

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

31822-SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Disc. Cirurgia Geral e Topografia Estrutural Humana - FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Esta pesquisa vai estudar se existem alterações genéticas que favoreçam o aparecimento da Doença Herniária. Os resultados poderão oferecer novos caminhos para o tratamento e com isto ajudar outros pacientes com este problema. Nesta pesquisa necessitamos estudar as células sanguíneas de indivíduos que tenham Hérnia inguinal e de indivíduos saudáveis, para saber se existe alguma diferença entre eles.

Para esta pesquisa necessitamos colher 10 mL de sangue de uma veia do braço, para analisarmos as características genéticas das células.

Esta coleta de sangue do braço poderá trazer uma pequena dor na hora da picada da agulha. O local da coleta poderá ficar arroxado, que desaparecerá em alguns dias.

A pesquisa vai ser financiada pela Universidade de São Paulo, CNPq e Hospital das Clínicas da FMUSP.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre a pesquisa, podendo solicitar esclarecimento de dúvidas.

Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Todos os seus dados referentes a esta pesquisa terão a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Firmamos o compromisso de utilizar este material biológico (sangue periférico) exclusivamente para esta pesquisa proposta.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Aldo Junqueira Rodrigues Junior: Serviço Cirurgia Geral-INCOR-HCFMUSP Fone 30695399.

Dra Consuelo Junqueira Rodrigues. Lab Investigação Médica LIM02 -HC-FMUSP fONE30617299

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador responsável
Profa Dra Consuelo J Rodrigues
CRM 31822

Pesquisador Executante
Lucimara Collodoro Rocha

7 BIBLIOGRAFIA

ABCI I, BILGI S, ALTAN A. Role of TIMP-2 in fascia transversalis on development of inguinal hernia formation in adults and infants. *Pediatr. Surg. Int.* 2005;22:600-04.

ABRAHAMSON, J. Etiology and pathophysiology of primary and recurrent groin hernia formation. *Surg. Clin. North Am.* 1998;78:953-72.

ARTEAGA-SOLIS E, GAYRAUD B, LEE SY, SHUM L, SAKAI L, RAMIREZ R. Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J. Cell. Biol.* 2001; 23:275-81.

BARROS MKP, RODRIGUES CJ, RODRIGUES NR, OLIVEIRA RP, BARROS TEP, RODRIGUES JUNIOR AJ. Aging of the elastic and collagen fibers in the human cervical interspinous ligaments. *Spine J.* 2002; 2:57-62.

BELLÓN JM, BAJO A, HOUNDUVILLA NG, GIMENO MJ, PASCUAL G, GUERRERO A, BUJÁN J. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. *Annals of Surgery.* 2001; 233(2):287-91.

BELLÓN JM, BUJAN J, HONDUVILLA NG, JURADO F, GIMENO MJ, TURNAY J, OLMO N, LIZARBE MA. Study of biochemical substrate and role of metalloproteinases in fascia transversalis from hernial processes. *Eur. J. Clin. Invest.* 1997;27:510-6.

BERNSTEIN EF, CHEN YQ, TAMAI K, SHEPLEY KJ, RESNIK KS, ZHANG H, TUAN R, MAUVIEL A, UITTO J. Enhanced Elastin and Fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *The Soc. Invest. Dermatol.* 1994;103:182-6.

BIERY NJ, ELDADAH ZA, MOORE CS, STETTEN G, SPENCER F, DIETZ HC. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics.* 1999;56(1), 70-7.

BORQUEZ P, GARRIDO L, MANTEROLA C, PENA P, SCHLAGETER C, ORELLANAJJ, ULLOA H, PENA JL. Study of collagen and elastic fibers of connective tissue in patients with and without primary inguinal hernia. *Ver.Med. Chil.* 2000;3131:1273-79.

BRAVERMAN IM, FONFERKO E. Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J. Invest. Dermatol.* 1982;78:434-43.

CANNON DJ, READ RC. Metastatic emphysema: a mechanism for acquiring inguinal herniation. *Ann. Surg.* 1981;194(3):270-8.

CARTA L, PEREIRA L, ARTEAGA-SOLIS E, LEE-ARTEAGA SY, LENART B, STARCHER B, MERKEL CA, SUKOYAN M, KERKIS A, HAZEKI N, KEENE DR, SAKAI LY, RAMIREZ F. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J. Biol. Chem.* 2005;281(12):8016-23.

CHARBONNEAU NJ, DZAMBA BJ, ONO RN, KEENE DR, CORSON GM, REINHARDT DP, SAKAI LY. Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. *J. Biol. Chem.* 2003;278(4): 2740-49.

CHARBONNEAU NL, ONO RN, CORSON GM, KEENE DR, SAKAI LY. Fine tuning of growth factor signals depends on fibrillin microfibril networks. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* 2004;72 (1): 37-50.

CLEARY EG, GIBSON MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 1983;10:97-209.

COLLOD-BÉROUD G, BÉROUD C, ADES L, BLACK C, BOXER M, BROCK DJH, HOLMAN KJ, DE PAEPE A, FRANCKE U, GRAU U, HAYWARD C, KLEIN HG, LIU W, NUYTINCK L, PELTONEN L, PEREZ ABA, RANTAMÄKI T, JUNIEN C, BOILEAU C. Marfan database (third edition): new mutations and new routines for the software. *Nucl. Acids Res.* 1998; 26(1):229-33.

COLLOD-BÉROUD G, LE-BOURDELLES S, ADES L, ALA-KOKKO L, BOOMS P, BOXER M, CHILD A, COMEGLIO P, DE PAEPE A, HYLAND JC, HOLMAN K, KAITILA I, LOEYS B, MATYAS G, NUYTINCK L, PELTONEN L, RANTAMAKI T, ROBINSON P, STEINMANN B, JUNIEN C, BÉROUD C, BOILEAU CC. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of a FBN1 polymorphism database. *Hum Mutat.* 2003; 22(3):199-208.

COLLOD G, BÉROUD C, SOUSSI T, JUNIEN C, BOLLEAU C. Software and database for the analysis of mutations in the human FBN1 gene. *Nucl. Acids Res.* 1996; 24(1):137-40.

CONDON RE. The anatomy of the inguinal region and its relationship to groin hernias. In: NYHUS LM & CONDON RE – *Hernia*, 2^a ed. Philadelphia, Lippincott, p.14-53. 1978.

COOPER DN. Human gene mutation in pathology and evolution. *J. Inher. Meta.Diseas.* 2002; 25:157-82.

CORSON GM, CHARBONNEAU NL, KEENE DR, SAKAI LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics.* 2004;86(3):461-72.

DANIELSEN I, KOBAYASHI T. Degeneration of dermal elastic fibres in relation to age and light-exposure. Preliminary report to an electron microscopic studies. *Acta. Derm. Venereol.* 1972;52:1-10.

DIETZ HC, CUTTING GR, PYERITZ RE, MASLEN CL, SAKAY LY, CORSON GM, PUFFENBERGER EG, HAMOSH A, NANTHAKUMAR EJ, CURRISTIN SM, STETTEN G, MEYERS DA, FRANCOMANO CA. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 352:337, 1991a.

DIETZ HC, MCINTOSH I, SAKAY LY, CORSON GM, CHALBERG SC, PYERITZ RE, FRANCOMANO CA. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level of EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics.* 1993;17:468-75.

DIETZ HC, PYERITZ RE. Mutations in the gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum. Molec. Genet.* 1995;4:1799-1809.

DIETZ HC, PYERITZ RE, HALL BD, CADLE RG, HAMOSH A, SCHWARTZ J, MEYERS, DA, FRANCOMANO, CA. The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15-q21.3. *Genomics.* 1991b; 9: 355.

DIETZ HC, PYERITZ RE, PUFFENBERGER EG, KENDZIOR RJ, CORSON GM, MASLEN CL, SAKAI LY, FRANCOMANO CA, CUTTING GR. Marfan phenotype variability in a Marfan family segregating a missense mutation in the epidermal growth factor-like motif of the fibrillin gene. *J. Clin. Invest.* 1992a; 89:1674-80.

DIETZ HC, SARAIVA JM, PYERITZ RE, CUTTING GR, FRANCOMANO CA. Clustering of fibrillin (FBN-1) missense mutations in Marfan syndrome patients at cysteine residues in EGF-like domains. *Hum. Mut.* 1992b;1:366-74.

DOWNING AK, KNOTT V, WERNER JM, CARDY CM, CAMPBELL ID, HANDFORD PA. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell.* 1996; 85 (4): 597-605.

FAHRENBACH WH, SANDBERG LB, CLEARY EG. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.* 1966;155:563.

FRIEDMAN DW, BOYD CD, NORTON P, GRECO RS, BOYARSKY AH, MACKENZIE JW, DEAK SB. Increase in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. *Ann. Surg.* 1993;218: 754-60.

FURTHMAYR H, WIEDEMANN H, TIMPL R, ODERMATT E, ENGEL J. Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. *Biochem J.* 1983;2:303-311.

GIBSON MA, HATZINIKOLAS G, KUMARATILAKE JS, SANDBERG LB, NICHOLL JK, SUTHERLAND GR, CLEARY EG. Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). *J. Biol. Chem.* 1996;2:1096.

GILTAY R, KOSTKA G, TIMPL R. Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins. *FEBS Lett.* 1997; 411(2-3):164-168.

GODFREY M, MENASHE V, WELEBER RG, KOLER RD, BIGLEY RH, LOVRIEN E, ZONANA J, HOLLISTER DW. Cosegregation of elastin-associated microfibrillar abnormalities with the Marfan phenotype in families. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46: 652.

GOEPEL C, HEFLER L, METHFESSEL HD, KOELBL H. Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2003;82:659-64.

GOH JTW. Biomechanical and biochemical assessments for pelvic organ prolapse. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2003;15:391-4.

GROSFELD JL. Current concepts in inguinal hernia in infants and children. *World J Surg.* 1989;13:506-515.

HANDFORD PA. Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix – Review. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000;1498: 84-90.

HANDFORD PA, BARON M, MAYHEW M, WILLIS A, BEESLEY T, BROWNLEE GG, CAMPBELL ID. The first EGF-like domain from human factor IX contains a high affinity calcium binding site. *EMBO J.* 1990; 9: 475.

HARRISON PW. Inguinal hernia: a study of the principles involved in surgical treatment. *Arch. Surg.* 1922;4:59-71.

HAY ED, HASTY DL, KIEHNAU KL. Fine structure of collagens and their relation to glucosaminoglycans (GAG). *Suppl Thromb Haemost.* 1978;63:129-51.

HAYWARD C, BROCK DJH. Fibrillin-1 mutations in Marfan syndrome and other type-1 fibrillinopathies. *Hum Mutat.* 1997; 10:415-23.

HENDERSON M, POLEWSKI R, FANNING JC, GIBSON MA. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. *J. Histochem. Cytochem.* 1996;44(12):1389-1397.

HOLLISTER DW, GODFREY M, SAKAY LY, PYERITZ RE. Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(3):152-9.

ISOGAI Z, ASPBERG A, KEENE DR, ONO RN, REINHARDT DP, SAKAY LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(6):4565-72.

JACKSON SR, AVERY NC, TARLTON JF, ECKFORD SD, ABRAMS P, BAILEY AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet.* 1996; 347:1658-61.

JUNGE K, ROSCH R, KLINGE U, SCHWAB R, PEIPER C, BINNEBOSEL M, SCHENTEN F, SCHUMPELICK V. Risk factors related to recurrence in inguinal hernia repair: a retrospective analysis. *Hernia.* 2006; 10(4):309-15.

KAINULAINEN K, KARTTUNEN L, PUHAKKA L, SAKAI L, PELTONEN L. Mutations in the fibrillin gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome. *Nature genetics.* 1994; 6: 64-69.

KAINULAINEN K, PULKKINEN L, SAVOLAINEN A, KAITILA I, PELTONE L. Location of chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *N.Engl. J. Med.* 1990; 323: 935.

KAYAOGU HA, HAZINEDAROGLU SM, BULENT ERKED A, KOCATURK PA, KAVAS GO, ARIBAL D. Comparison of the plasma and hernia sac tissue copper levels in direct and indirect inguinal hernia patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005; 108:53-59.

KEENE DR, MADDOX BK, KUO HJ, SAKAI LY, GLANVILLE RW. Extraction of extendable beaded structures and their identification as fibrillin-containing extracellular matrix microfibrils. *J. Histochem Cytochem.* 1991; 39:441.

KEITH A. On the origin and nature of hernia. *Brit. J. Surg.* 1924; 11:455-75.

KIELTY CM, SHUTTLEWORTH CA. The role of calcium in organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett.* 1993; 2:103.

KIELTY CM, WESS TJ, HASTON L, ASHWORTH JL, SHERRATT MJ, SHUTTLEWORTH CA. Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J. Musc. Res. And Cell Mot.* 2002; 23:581-96.

KLINGE U, ZHENG H, SI ZY, SCHUMPELICK V, BHARDWAJ R, MUYS, L, KLOSTERHALFEN B. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia. *Eur. Surg. Res.* 1999a; 31:480-90.

KLINGE U, ZHENG H, SI ZY, SCHUMPELICK V, BHARDWAJ R, KLOSTERHALFEN B. Synthesis of type I and III collagen, expression of fibronectin and matrix metalloproteinases-1 and -13 in hernial sac of patients with inguinal hernia. *Int. J. Surg. Investig.* 1999b; 1:219-27.

LEE B, GODFREY M, VITALE E, HORI H, MATTEI MG, SARFARAZI M, TSIPOURAS P, RAMIREZ F, HOLLISTER DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two fibrillin genes. *Nature.* 1991; 352: 230.

LEHNERT B, WADOUGH F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1992; 6(2):134-7.

LI X, PEREIRA L, ZHANG H, SANGUINETI C, RAMIREZ F, BONADIO J, FRANCKE U. Fibrillin genes map to regions of conserved mouse/human synteny on mouse chromosomes 2 and 18. *Genomics.* 1993; 18:667-72.

LICHTENSTEIN IL, SCHULMAN AG, AMID PK. The cause, prevention and treatment of recurrent groin hernia. *Surg. Clin. North Am.* 1993; 73:529-44.

LIU WG, FARACO J, QIAN CP, FRANCKE U. The gene for microfibril-associated protein-1 (MFAP1) is located several megabases centromeric to FBN1 and is not mutated in Marfan syndrome. *Human Genet.* 1997; 99:578-84.

LOW FN. Microfibrils: fine filamentous components of the tissue space. *Anat Rec.*, 1962; 142:131.

MAMADA M, YORIFUJI T, JUNKO Y, KUROKAWA K, MASAHIKO K, TORU M, NAKAHATA T. Fibrillin 1 gene polymorphism is associated with tall stature of normal individuals. *Hum Genet.* 2006 ; 6:263-5.

MÄKINEN J, KÄHARI VM, SÖDERSTRÖM K, VUORIO E, HIRNOVEN T. Collagen synthesis in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1987;24:319-25.

MASLEN, C. L., CORSON, G. M., MADDOX, B. K., GLANVILLE, R. W., SAKAY, L. Y. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature.* 1991, 352: 334.

MÁTYÁS G, DE PAEPE A, HALLIDAY D, BOILEAU C, PALS G, STEINMANN B. Evaluation and application of denaturing HPLC for mutation

detection in Marfan syndrome: identification of 20 novel mutations and two novel polymorphisms in the FBN1 gene. *Hum Mut.* 2002; 19:443-56.

MERKEL C. Geração e análise de um animal “knockout” para a fibrilina-1, o produto gênico envolvido na Síndrome de Marfan. São Paulo, 2006. 99p. *Tese (Doutorado)* – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

MILEWICZ DM, MICHAEL K, FISHER N, COSELI JS, MARKELLI T, BIDDINGER A. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aneurysms. *Circulation.* 1996;94:2708-11.

MILLER AS, DYKES DD, POLESKY, HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988;16:1215.

MONTGOMERY RA, GERAGHTY MT, BULL E, GELB BD, JOHNSON M, VCINTOSH I, FRANCOMANO CA, DIETZ HC. Multiple molecular mechanisms underlying subdiagnostic variants of Marfan syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;63:1703-11.

MOREN A, OLOFSSON A, STENMAN G, SAHLIN P, KANZAKI T, CLAESSEON-WELSH L, TEN DIJKE P, MIYAZONO K, HELDIN CH. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 1991; 10(5):1091-1101.

MORRIS CA, DEMSEY AS, LEONARD, CO, DILTS C, BLACKBURN BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J. Pediatr.* 1988; 13:214-9.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.* 2001; 33:7-21.

NAGASE T, NAKAYAMA M, NAKAJIMA D, KIKUNO R, OHARA O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2001; 8:85-95.

NEPTUNE ER, FRISHMEYER PA, ARKING DE, MYERS L, BUNTON TE, GAYRAUD B, RAMIREZ F, SAKAY LY, DIETZ HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan Syndrome. *Nature Genetics.* 2003; 33:407.

NIJBROEK G, SOOD S, MCINTOSH I, FRANCOMANI CA, BULL E, PEREIRA L, RAMIREZ F, PYERITZ RE, DIETZ H. Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:8-21.

NYHUS LM, CONDON RE, HARKINS HN. Clinical experiences with preperitoneal hernia repair for all types of hernia of the groin. *Am J.Surg.* 1960; 100:234-44.

OLOFSSON A, ICHIJO H, MOREN A, DIJKE P, MIYAZONO L, HELDIN CH. Efficient association of na amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. 1995. *J. Biol. Chem.* 270(52):31294-7.

ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:2766-70.

PALZ M, TIECKE F, BOOMS P, GOLDNER B, ROSENBERG T, FUCHS J, SKOVBY F, SCHUMACHER H, KAUFMANN UC, VON KODOLITSCH Y, NIENABER CA, LEITNER C, KATZKE S, VETTER B, HAGEMEIERS C, ROBINSON PN. Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3-prime region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 2000; 91: 212-21.

PANS A, ALBERT A, LAPIERE CM, NUSGENS B. Biochemical study of collagen in adult groin hernias. *J Surg Res.* 2001; 95:107-13.

PEACOCK JUNIOR EE, MADDEN JW. Studies on the biology and treatment of recurrent inguinal hernia: II. Morphological changes. *Ann.Surg.* 1974; 179: 567-71.

PEREIRA L, ANDRIKOPOULOS K, TIAN J, LEE SY, KEENE DR, ONO R, REINHARDT DP, SAKAI LY, BIERY NJ, BUNTON T, DIETZ HC, RAMIREZ F. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nature Genetics.* 1997;17:218.

PEREIRA L, D'ALESSIO M, RAMIREZ F, LYNCH JR, SYKES B, PANGILINAN T, BONADIO J. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 961.

PEREIRA L, LEE SY, GAYRAUD B, ANDRIKOPOULOS K, SHAPIRO SD, BUNTON T, BIERY NJ, DIETZ HC, SAKAY LY, RAMIREZ F. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:3819.

PFUFF M, REINHARDT DP, SAKAY LY, TIMPL R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* 1996; 384(3): 247-50.

POMPEU HH. Mutação no exon 20 do gene da elastina em mulheres com incontinência urinária de esforço decorrente de fatores extrínsecos à uretra.

São Paulo, 2004. 96p. *Tese (Doutorado)* – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

PUTNAM EA, CHO M, ZINN AB, TOWBIN JÁ, BYERS PH, MILEWICZ DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. *Am.J. Med. Genet.* 1996; 62(3):233-42., 1996

PYERITZ RE. The Marfan syndrome. *Ann. Rev. Med.* 2000; 51:481-510.

QUINTAS M; RODRIGUES CJ; YOO JH; RODRIGUES JR. AJ. Age related changes in the elastic fiber system of the interfoveolar ligament. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.* 2000; 55:83-6.

READ RC. A review: the role of protease-antiprotease imbalance in the pathogenesis of herniation and abdominal aortic aneurysm in certain smokers. *Postgrad. Gen. Surg.* 1992; 14:161-65.

READ RC. Attenuation of rectus sheath in inguinal herniation. *Am. J. Surg.* 1970; 120:610-4.

READ RC. Basic features of abdominal wall herniation and its repair. In *Shackelford's surgery of the alimentary tract.* 4ed. George D. Zuidema, 1996.

READ RC. Recent advances in the repair of groin herniation. *Curr. Probl. Surg.* 2003; 40:1-80.

REINBOTH, B., HANSSSEN, E., CLEARY, E. G., GIBSON, M. A. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(6):3950-7.

RICCI JUNIOR J. Polimorfismo do exon 20 do gene da elastina em indivíduos portadores de doença diverticular dos colons. São Paulo, 2004. 144p. *Tese (Doutorado)* – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

ROBINSON PN, GODFREY M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genetics.*2000; 37(1): 9-25.

RODRIGUES CJ, RODRIGUES JUNIOR AJ. A comparative study of aging of the elastic fiber system of the diaphragm and the rectus abdominis muscles in rats. *Brz. J. Reser. Biol. Med.* 2000; 33:1449-54.

RODRIGUES CJ, RODRIGUES JUNIOR, AJ, BOHM GM. The effects of aging on the muscle fibers and collagen content of the diaphragm: A comparison with the rectus abdominis muscle. *Gerontology.*1996; 42:218-28.

RODRIGUES CJ, SACCHETTI JC, RODRIGUES JUNIOR AJ. Age-related changes in the elastic fiber network of the human splenic capsule. *Lymphology*, 1999; 32:64-9.

RODRIGUES CJ, YOO J, RODRIGUES JUNIOR AJ. Elastin point mutations in patients with inguinal hernia. *Genetics and Molecular Biology* 29: 45-46, 2006.

RODRIGUES JUNIOR AJ. Estudo morfofuncional do sistema de fibras elásticas da fáscia transversal na região inguinal no homem em várias idades. São Paulo, 1987. 75p. *Tese (Livre Docência)* – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES JUNIOR AJ, CASTRO DE TOLOSA E M, FERRAZ DE CARVALHO, CA. Electron microscopic study on the elastic and elastic related fibers in the human fascia transversalis at different ages. *Gegenbaurs. Morphol. Jahrb.* 1990; 136:645-52.

RODRIGUES JUNIOR, AJ, RODRIGUES CJ, DA CUNHA ACP, YOO J. Quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the transversalis fascia in direct and indirect inguinal hernia. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.* 2002;257(6):265-70.

ROMERO R, KUIVANIEMI H, TROMPO G, OLSON JM. The design, execution and interpretation of genetic association studies to decipher complex diseases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002;187:1299-312.

ROSCH R, KLINGE U, SI Z, JUNGE K, KLOSTERHALFEN B, SCHUMPELICK V. A role for the collagen I/III and MMP-1/13 genes in primary inguinal hernia? *BNC Med Genet.* 2002;3:2-8.

ROSENBLOOM J. Biology of disease. Elastin: relation of protein and gene structure to disease. *Lab. Invest.* 1984; 51:605-23.

ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MECHAM R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB.*1993; 7:1208-18.

ROSS JM, MCINTIRE LV, MOAKE JL, KUO HJ, QIAN RQ, GLANVILLE R W, SCHWARTZ E, RAND JH. Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thromb Haemost.* 1998; 79(1):155-61.

ROSS R, BORNSTEIN P. The elastic fiber. *J. Cell Biol.* 1969; 40:367-81.

ROSS R. The elastic fiber. A review. *J. Histochem. Cytochem.* 1973; 21:199-208.

RUSSELL RH. The sacular theory of hernia and the radical operation. *Lancet*.1906. 3:1197-1203.

SAKAMOTO, H, BROEKELMANN, T., CHERESH, D. A., RAMIREZ, F., ROSENBLOOM, J., MECHAM, RP. Cell-type specific recognition of RGD and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:4916-22.

SAKAY LY, KEENE DR, ENGVALL E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell. Biol.* 1986; 103:2499-2509.

SAKAY LY, KEENE DR, GLANVILLE RW, BACHINGER HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective microfibrils. *J. Biol. Chem.* 1991; 22:147-63.

SANDBERG, L.B.; SOSKEL, N.T.; LESLIE, J.G. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N. Eng. J. Med.* 1981; 304:566-79.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74:5463-7.

SCHRIJVER I, LIU W, FRANCKE U. The pathogenicity of the Pro1148Ala substitution in the FBN1 gene: causing or predisposing to Marfan syndrome and aortic aneurysm, or clinically innocent? *Hum Genet.* 1997; 99(5):607-11.

SCHRIJVER I, LIU W, ODOM R, BRENN T, OEFNER P, FURTHMAYR H, FRANCKE U. Premature termination mutations in FBN1: distinct effects on differential allelic expression and on protein and clinical phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:223-37.

SHERRATT MJ, WESS TJ, BALDOCK C, ASHWORTH JL, PURSLOW PP, SHUTTLEWORTH CA, KIELTY CM. Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly – Review. *Micron.* 2001; 32:185-200.

SCHUMPELICK V. Special issue-Collagen. *Hernia.* 2006: 10:453.

SCHUMPELICK V, TREUTNER, KH, ARLT, G. Inguinal hernia repair in adults. *Lancet.* 1994; 344:409-19.

SOOD S, ELDADAH ZA, KRAUSE WL, MCINTOSH I, DIETZ HC. Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat. Genet.* 1996;12:209-11.

TANIGUCHI S, UEDA K, INOUE T, LI TS, KUGA T, HAMANI K. Impact of collagen subtype proportions in peritoneal tissues on inguinal hernia formation in adults and infants. *Pediatr Surg Int.* 2006; 22:600-604.

TASSABEHJI M, METCALFE K, DONNAL D, HURST J, REARDON W, BRUCH M, READ AP. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum. Mol. Gen.* 1997; 6:1029-36.

TIECKE F, KATZKE S, BOOMS P, ROBINSON PN, NEUMANN L, GODFREY M, MATHEWS KR, SCHEUNER M, HINKEL GK, BRENNER RE, HÖVELS-GÜRICH HH, HAGEMEIERS C, FUCHS J, SKOVBY F, ROSENBERG T. Classic, atypically severe and neonatal marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. *Eur. J. Human Gen.* 2001; 9:13-21.

TIEDEMANN K, BÄTGE B, MÜLLER PK, RINHARDT DP. Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(38):36035-42.

TILSTRA DJ, BYERS PH. Molecular basis of hereditary disorders of connective tissue. *Annu Rev Med.* 1994; 45:149-63.

TRASK TM, TRASK BC, RITTY TM, ABRAMS WR, ROSENBLOOM J, MECHAM RP. Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of fibrillin-1 and fibrillin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(32):24400-6.

TSIPOURAS P, DEL MASTRO R, SARFARAZI M, LEE B, VITALE E, CHILD AH, GODFREY M, DEVEREUX RB, HEWETT D, STEINMANN B, VILJOEN D, SYKES BC, KILPATRICK M, RAMIREZ F. The International Marfan syndrome collaborative study – genetic linkage of the Marfan syndrome, ectopia lentis and congenital contractural arachnodactyly of the fibrillin genes on chromosomes 15 and 5. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326:905-9. 1992

TSIPOURAS P, SARFARAZI M, DEVI A, WEIFFENBACH B, BOXER M. Marfan syndrome is closely linked to a marker on 15q1.5-q2.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 44-86.

TYNAN K, COMEAU K, PEARSON M, WILGENBUS P, LEVITT D, GASNER C, BERG MA. Mutation screening of complete fibrillin-1 coding sequence: report of five new mutations, including two in 8-cysteine domains. *Hum. Mol. Genet.* 1993;2:1813-21.

UDEN A, LINDHAGEN T. Inguinal hernia in patients with congenital dislocation of the hip: a sign of general connective tissue disorder. *Acta. Orthop. Scand.* 1988; 59:667-8.

UITTO J, FAZIO MJ, OLSEN DR. Cutaneous aging: molecular alterations in elastic fibers. *J. Cut. Aging Cosmetic. Dermatol.* 1989; 7:1021-8.

WAGH, PV, LEVERICH AP, SUN CN, WHITE HJ, READ RC. Direct inguinal herniation in men: a disease of collagen. *J. Surg. Res.* 1974;17: 425-33.

WAGH PV, READ RC. Collagen deficiency in rectus sheath of patients with inguinal herniation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971;137:382.

WANG M, WANG JY, CISLER J, IMAIZUMI K, BURTON BK, JONES MC, LAMBERTI JJ, GODFREY M. Three novel fibrillin mutations in exons 25 and 27: classic versus neonatal Marfan syndrome. *Hum Mutat.* 1997; 9:359-62.

WATANABE Y, YANO S, KOGA Y, YUKIZANE S, NISHIYORI A, YOSHINO M, KATO H. P1148A in fibrillin-1 is not a mutation leading to Shprintzen-Goldberg syndrome. *Hum Mut.* 1997; 10:326-7.

WATSON EBR, GRIFFITHS EMC, CRAVEN NM, SHUTTLEWORTH CA, KIELTY CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *Soc. Invest. Dermatol.* 1999; 112(5):782-7.

WHEATLEY HM, TRABOULSI EI, FLOWERS BE. Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. Relevance to the Marfan syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 1995; 113:103-9.

WIRTSCHAFTER ZT, BENTLEY JP. Hernias as a collagen maturation defect. *Ann. Surg.* 1964; 160:852-9.

WOLWACZ JUNIOR I, TRINDADE MRM, CERSKI CT. O colágeno em fásia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à laparoscopia. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(3):196-202.

YIN W, SMILEY E, GERMILLER J, SANGUINETTI C, LAWTON T, PEREIRA L, RAMIREZ F, BONADIO J. Primary structure and developmental expression of fbn-1, the mouse fibrillin gene. *J.Bio.Chem.* 1995; 270:1798-95

YOO, J.H. Alterações do gene da elastina nos pacientes portadores de hérnia inguinal. São Paulo, 2003. 80p. *Tese (Doutorado)* – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

ZHANG H, APFELROTH SD, HU W, DAVIS EC, SANGUINETI C, BONADIO J, MECHAM RP, RAMIREZ F. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices *J.Cell Biol.* 1994; 124:855-863.

ZHANG H, HU W, RAMIREZ F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* 1995;129: 1165-76.