

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IÁSCARA COELHO DOS SANTOS

ANÁLISE DO PERFIL DO GENE *COL27A1*
NO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO FEMININO

CURITIBA

2014

IÁSCARA COELHO DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL DO GENE *COL27A1*
NO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO FEMININO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Concentração em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Salmo Raskin

CURITIBA

2014



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos seis dias do mês de junho de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ANÁLISE DO PERFIL DO GENE COL27A1 NO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO FEMININO" apresentada por IÂSCARA COELHO DOS SANTOS para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Salmo Raskin PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza PUCPR	
Profa. Dra. Lilian Pereira Ferrari UNIBRASIL	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Salmo Raskin	Conceito: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza	Conceito: <u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Lilian Pereira Ferrari	Conceito: <u>Aprovado</u>
	Conceito Final: <u>Aprovado</u>

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Salmo Raskin
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Doutor Salmo Raskin pela competência, entusiasmo e confiança com que me brindou. Sou inteiramente grata por essa orientação, que ultrapassa a realização da dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de participar do curso de mestrado.

Ao Hospital Pequeno Príncipe, instituição coparticipante nessa pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular (LABIM) pela importante infraestrutura. E aos seus funcionários, em especial, à Desiree Cigaran Schuck pela cooperação técnica.

Ao Grupo O' Boticário pelo apoio financeiro e pela disponibilidade de seus funcionários.

Aos médicos, Dr. César Cavalli Sabbaga, Dra. Ruth Maria Graf e Dr. Joel Jacobovicz, pela indispensável colaboração.

Aos indivíduos participantes desse estudo e aos representantes legais de parte dos mesmos, pela valiosa contribuição.

A toda a minha família pelo incentivo e pela torcida, e, em especial aos meus pais, que me inspiraram na busca e concretização dos meus sonhos.

Gostaria de expressar os mais profundos agradecimentos a todos que participaram direta ou indiretamente nesta jornada.

(...) o empirismo e o racionalismo estão ligados, no pensamento científico, por um estranho laço tão forte como o que une o prazer à dor. Com efeito, um deles triunfa dando razão ao outro: o empirismo precisa ser compreendido; o racionalismo precisa ser aplicado. Um empirismo sem leis claras, sem leis coordenadas, sem leis dedutivas não pode ser nem pensado, nem ensinado; um racionalismo sem provas palpáveis, sem aplicação à realidade imediata não pode convencer plenamente. Prova-se o valor real de uma lei empírica fazendo dela a base de um raciocínio. Legitima-se um raciocínio fazendo dele a base de uma experiência.

(BACHELARD, 1974, p. 166)

RESUMO

O envelhecimento humano é um processo universal que apresenta uma complexa interação de fatores genéticos, epigenéticos e epidemiológicos. As mudanças estruturais intrínsecas ocorrem como uma consequência natural do envelhecimento e são geneticamente determinadas. A pele humana é o maior órgão multifuncional do corpo, e, suas alterações ao longo dos anos estão entre os sinais mais visíveis do envelhecimento biológico do organismo. O envelhecimento humano cutâneo é influenciado por genes pertencentes a diferentes categorias de processos celulares que mostram alterações de expressão com o passar do tempo. O objetivo deste estudo foi o de pesquisar o perfil de expressão do gene *COL27A1* (*collagen, type XXVII, alpha 1*) na pele, em diferentes fases do desenvolvimento humano do gênero feminino, a fim de detectar mudanças em seu nível de expressão, através da quantificação de suas moléculas de RNA mensageiro, por reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Foram utilizadas amostras de pele pertencentes a doze indivíduos do gênero feminino, divididos em quatro grupos, representando fases distintas do desenvolvimento humano: o primeiro grupo foi composto de indivíduos do nascimento até antes da menarca; o segundo grupo foi o de indivíduos entre a menarca e o final da terceira década de vida (o início do declínio fisiológico do organismo); o terceiro grupo compreendeu o período do início do declínio fisiológico do organismo até o início da menopausa fisiológica; e o quarto grupo abrangeu mulheres após a menopausa fisiológica. Os resultados mostraram aumento do nível de expressão deste gene após a menarca e após a menopausa (no início e no final do período reprodutivo de indivíduos do gênero feminino). Os mais altos níveis de expressão ocorreram após a menopausa fisiológica. O aumento de expressão do gene *COL27A1* teve forte correlação com eventos influenciados por alterações hormonais.

Palavras-chave: Expressão gênica. Gene *COL27A1*. Envelhecimento cutâneo.

ABSTRACT

The human aging is a universal process that presents a complex interaction of genetic, epigenetic and epidemiological factors. The intrinsic structural changes occur as a natural consequence of aging and are genetically determined. The human skin is the largest multifunctional organ of the body, and its changes over the years are among the most visible signs of aging the biological organism. Human cutaneous ageing is influenced by genes belonging to different categories of cellular processes that show expression changes over time. The objective of this study was to search the profile of expression *COL27A1* gene (*collagen, type XXVII, alpha 1*) on the skin, at different stages of human development of the female, in order to detect changes in your level of expression, through the quantification of their messenger RNA molecules, by quantitative polymerase chain reaction in real time (RT-qPCR). Skin samples were used belonging to twelve individuals of the female, divided into four groups, representing different stages of human development: the first group was composed of individuals from birth until before the menarche; the second was the group of individuals between menarche and the end of the third decade of life (the beginning of physiological decline of the organism); the third group comprised the period of beginning of physiological decline of the body until the onset of physiological menopause; and the fourth group encompassed women after menopause physiological. The results showed increased level of expression of this gene after menarche and after menopause (at the beginning and end of the period of reproductive individuals of the female). The highest levels of expression occurred after the physiological menopause. The increased expression of *COL27A1* gene had a strong correlation with events influenced by hormonal changes.

Keywords: Gene expression. Gene *COL27A1*. Skin aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos Colágenos em Subfamílias	18
Tabela 2 – O Gene <i>COL27A1</i> (<i>Collagen, Type XXVII, Alpha 1</i>)	21
Figura 1 – Rede de Interação de Genes e Proteínas com o Gene <i>COL27A1</i>	20
Figura 2 – A Barra Vermelha indica a localização do Gene <i>COL27A1</i> no Cromossomo 9	21
Figura 3 – Exon, Intron e URTs do Gene <i>COL27A1</i>	22

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	- Alfa
$\alpha 1 - \alpha 6$	- Cadeias Alfas de Colágenos
<i>ACTB</i>	- <i>Beta - actin</i>
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celsius
cDNA	- DNA complementar
(I – XXVIII)	- 28 Tipos de Colágenos
<i>COL5A1</i>	- <i>Collagen, Type V, Alpha 1</i>
<i>COL5A3</i>	- <i>Collagen, Type V, Alpha 3</i>
<i>COL11A1</i>	- <i>Collagen, Type XI, Alpha 1</i>
<i>COL11A2</i>	- <i>Collagen, Type XI, Alpha 2</i>
<i>COL27A1</i>	- <i>Collagen, Type XXVII, Alpha 1</i>
CpG	- <i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
C_T	- Ciclo limiar de amplificação (do inglês, <i>Cycle Threshold</i>)
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>).
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados (do inglês, <i>Deoxyribonucleotide Triphosphates</i>)
<i>18S rRNA</i>	- <i>RNA ribosomal 18S</i>
<i>GAPDH</i>	- <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
LABIM	- Laboratório de Biologia Molecular
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
mRNA	- RNA mensageiro
μL	- Microlitro
MGB	- <i>Minor Groove Binder</i> (Ligante no Sulco Menor)
ng	- Nanograma
nM	- Nanomolar
NTC	- <i>No Template Control</i> (Amostra que não contém Ácido Nucleico)
mM	- Micromolar
pb	- Pares de bases nitrogenadas

PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PPGCS	- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
<i>Primers</i>	- Oligonucleotídeos Iniciadores
PUCPR	- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RT-qPCR	- PCR Quantitativa em Tempo Real
RNA	- Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNA-Seq	- Sequenciamento de RNA (do inglês, <i>RNA sequencing</i>)
RT	- Transcriptase Reversa (do inglês, <i>Reverse Transcriptase</i>)
s	- Segundos
SAM	- Análise do Significado de Microarranjos (do inglês, <i>Significance Analysis Microarrays</i>)
SNP	- Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRH	- Terapia de Reposição Hormonal (do inglês, <i>Therapy Replaced Hormone</i>)
UTRs	- Regiões não traduzidas (do inglês, <i>Untranslated regions</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 ENVELHECIMENTO	12
2.1.1 Envelhecimento Cutâneo	15
2.1.1.2 Classificação e Etiopatogenia	16
2.2 COLÁGENOS	16
2.3 GENE <i>COL27A1</i> (<i>Collagen, Type XXVII, Alpha 1</i>)	19
2.4 EXPRESSÃO GÊNICA	22
2.4.1 Regulação da Expressão Gênica	23
2.4.2 Quantificação da Expressão Gênica	23
2.4.2.1 <i>Fold Change</i>	24
3 ARTIGO	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	46

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, após um grande progresso no conhecimento sobre a estrutura e a função cromossômica, aprofundou-se a compreensão da organização do genoma humano no nível de sequência de DNA. Adicionalmente, o crescente aumento da expectativa média de vida da população, e os avanços no campo da gerontologia levaram a um maior número de pesquisas sobre o processo de envelhecimento. Porém, a despeito das inúmeras teorias, não foi comprovada uma causa final para este processo. A isto se atribui a carência de marcadores biológicos eficazes e a própria natureza do envelhecimento, cujas perdas funcionais tendem a ser lineares em função do tempo (PAPALÉO; BORONOV, 2002).

O envelhecimento biológico é um processo universal com influências de fatores genéticos, epigenéticos e epidemiológicos (MONTESANTO *et al.*, 2012). Mudanças estruturais intrínsecas ocorrem como consequência natural do envelhecimento e são geneticamente determinadas (FARAGE *et al.*, 2008). A pele humana é o maior órgão multifuncional do corpo (WYSOCKI, 1999), e suas alterações estão entre os sinais mais visíveis do envelhecimento (FORE, 2006). Os colágenos estão presentes em muitos lugares do corpo, inclusive na pele. A literatura descreve 28 tipos de colágenos identificados (RICHARD-BLUM, 2011). O colágeno tipo XXVII é codificado pelo gene *COL27A1*, e apresentou aumento no nível de sua expressão em um experimento que investigou os genes envolvidos no processo de envelhecimento natural da pele humana, em indivíduos do gênero masculino, por meio de hibridização em microarranjos de DNA e amplificação quantitativa. (LENER *et al.*, 2006).

Assim, este estudo foi realizado para pesquisar o perfil de expressão do gene *COL27A1* na pele, em diferentes fases do desenvolvimento humano do gênero feminino, a fim de investigar mudanças do seu nível de expressão, através da quantificação de suas moléculas de RNA mensageiro por RT-qPCR (HIGUCHI *et al.*, 1993). As diferentes fases aqui consideradas foram delimitadas pela menarca, pelo início do declínio fisiológico do organismo, no final da terceira década de vida (TROEN, 2003), e pela menopausa fisiológica. O objetivo foi o de determinar se ocorreria variabilidade do nível de expressão do gene *COL27A1* durante o desenvolvimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento biológico é um fenômeno universal e comum a praticamente todos os seres vivos. A associação entre genes e processo de envelhecimento pode ser demonstrada pela ampla variação no tempo de sobrevida máximo encontrado entre as diferentes espécies. Em humanos, a longevidade média está em torno de 80 anos, com um aparente potencial máximo de sobrevivência de 120 anos (KAPPELER; EPELBAUM, 2005). Atualmente se pensa o processo de envelhecimento através das vias metabólicas de sinalização que regulam este processo, como a sinalização de insulina/fator de crescimento semelhante à insulina 1, a restrição alimentar e a redução da função mitocondrial, que podem modular a proteostase. É provável que essas três vias afetem o envelhecimento separadamente, porque o atingindo simultaneamente, levam a um aumento aditivo do tempo de vida (TAYLOR; DILLIN, 2011).

Estudos sobre a longevidade com a *Drosophila melanogaster* e com ratos mostraram resultados semelhantes: aumento da duração de vida média através de cruzamentos entre organismos de vida mais longa. Indivíduos com pais longevos, vivendo sob as mesmas influências do meio ambiente de indivíduos com pais não longevos, apresentam maior tempo de vida (PEARL; PEARL, 1934). Em seguimento a este estudo, foi demonstrado que a influência não era simétrica: o efeito pai-filha era mais fraco, enquanto o efeito mãe-filho era mais forte (ABBOTT *et al.*, 1974).

A hereditariedade da longevidade foi estimada em 0,26 para o gênero masculino e 0.23 para o gênero feminino em gêmeos dinamarqueses, nascidos entre 1870 e 1900 (HERSKIND *et al.*, 1996). Este foi uma expansão do estudo relatado por McGue *et al.* (1993). O modelo incluiu dominância genética e fatores ambientais. Usando um banco de dados abrangente da população da Islândia sobre gerações longevas, foi encontrado que parentes em primeiro grau tinham quase duas vezes mais chances de serem indivíduos longevos. Além disso, taxas de mortalidade específicas foram significativamente menores na prole desses pais, especialmente depois dos 70 anos (GUDMUNDSSON *et al.*, 2000). Análise realizada em famílias centenárias nos Estados Unidos mostrou descendentes masculinos com pelo menos 17 vezes mais chance de atingir a

idade centenária, e descendentes femininos com 8 vezes mais essa chance (PERLS *et al.*, 2002). Estudo sobre gêmeos masculinos e femininos, monozigóticos e dizigóticos do mesmo gênero, em populações sueca, finlandesa e dinamarquesa, nascidos entre 1870 a 1910 e seguidos até 2003-2004, sugeriu que as influências genéticas na esperança de vida são mínimas antes dos 60 anos de idade, mas aumentam posteriormente (HJELMBORG; IACHINE; SKYTTHE, 2006).

A replicação finita do tempo de vida celular *in vitro*, conhecido como o fenômeno de Hayflick (HAYFLICK, 1965), mostra que fibroblastos humanos normais têm aproximadamente 60 replicações em cultura, a partir de célula de recém-nascido. Nos indivíduos portadores da síndrome de Werner, caracterizada por envelhecimento precoce, obtém-se apenas 20 replicações. Essa capacidade limitada foi confirmada para células semelhantes derivadas de outras espécies, e foi determinado um valor único para cada espécie (FARAGHER *et al.*, 1993). Em meio de cultura, as células exibem diferentes graus de crescimento nos diversos estágios de sua evolução. Nas fases mais iniciais, as células proliferam mais rapidamente, à medida que o tempo passa, o processo vai se tornando progressivamente mais lento (MARTIN; SPRAGUE; EPSTEIN, 1970).

Uma das modulações genéticas associadas ao envelhecimento que determina o limite replicativo celular é o encurtamento telomérico. As extremidades dos cromossomos, denominadas telômeros consistem em sequencias especializadas de DNA. A enzima telomerase, que é uma transcriptase reversa, aumenta os telômeros nas pontas dos cromossomos durante a divisão celular. Em humanos, a telomerase usa seu próprio RNA como molde para adicionar uma repetição de DNA hexamérica (TTAGGG). Durante o desenvolvimento, à medida que as células se diferenciam, o funcionamento da telomerase declina e os telômeros se encurtam, até um ponto em que a replicação de DNA não é mais possível. Postula-se que quando o telômero chega a este ponto desencadeia processos biológicos programados que levam à morte da célula envelhecida - morte celular programada ou apoptose (COMAI; LI, 2004). A senescência celular poderia acumular-se nos tecidos envelhecidos e alterar o padrão de expressão gênica, contribuindo para a fixação de um fenótipo envelhecido (SHIMAMOTO; SUGIMOTO; FURUICHI, 2004). Embora esse relógio interno do envelhecimento trabalhe em células somáticas normais, o encurtamento telomérico não ocorre como uma regra geral. Os queratinócitos da epiderme apresentam o encurtamento do telômero em cultura celular, mas não *in vivo* (BOUKAMP, 2005) e o comprimento dos telômeros são mantidos em células do córtex cerebral (TAKUBO *et al.*, 2002).

O envelhecimento está associado ao acúmulo de mutações somáticas nos genes reguladores, que levam à perda do controle coordenado do crescimento e da função celular. Vários genes supressores tumorais inibem a atividade de oncogenes que de outra maneira fariam as células maduras sofrerem mitoses anormais, resultando em tumores (AAROSON, 1991). Durante o desenvolvimento normal, os hormônios esteroides servem como ativadores de genes específicos que estimulam o ritmo mitótico e o crescimento dos órgãos reprodutores. A supressão metabólica da ação dos genes supressores tumorais permite que ocorra uma proliferação celular controlada. Quando os níveis hormonais caem com a idade, os genes supressores tumorais se tornam novamente ativos, a menos que tenham sofrido mutações, de modo que a função supressora esteja perdida. Essas alterações mutagênicas são provavelmente responsáveis pela probabilidade aumentada de tumores no envelhecimento (WEINBERG, 1991).

A atividade do hipotálamo depende da expressão de genes específicos, que mudam sua expressão com a idade, condicionando um conjunto de funções diretamente ao sistema neuroendócrino, controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (FINCH *et al.*, 1984). O sistema neuroendócrino, sob a influência dos neurotransmissores e neuropeptídeos, regulam a liberação e inibição de hormônios secretados na circulação sanguínea (MULLER *et al.*, 1993). O declínio da capacidade reprodutiva feminina é uma óbvia mudança neuroendócrina idade-dependente. A menopausa e suas características (diminuição de hormônios ovarianos, aumento de gonadotrofinas) são fenótipos do envelhecimento (WISE *et al.*, 1996). Os hormônios desempenham um papel importante na manutenção da função integrativa e trófica de tecidos e as suas deficiências na deterioração da função tecidual (SONNTAG *et al.*, 1999).

Um processo considerado como um mecanismo epigenético que controla a expressão gênica das células é a metilação do DNA. Esta consiste em uma modificação covalente do DNA, na qual um grupamento metil é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (SZYF, 2007). A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG de células diferenciadas, e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (MORGAN *et al.*, 2004). A perda de metilação seria um mecanismo epigenético associado à idade que influenciaria no relógio celular, enquanto que células tumorais mantêm constantes os

seus níveis de metilação de DNA. Além do papel da metilação no câncer, estudos adicionais sugerem que a metilação poderia influenciar no aparecimento de doenças neurodegenerativas (CARVALHO; PAYÃO; SMITH, 2000).

Não se sabe se o envelhecimento humano em si possa ser lentificado. Estudos moleculares podem contribuir para a compreensão do processo de envelhecimento. E dentro deste processo, o envelhecimento cutâneo possui um grande destaque, por causar prejuízo não apenas estético, mas também em outros importantes mecanismos do organismo. A pele é o maior órgão do corpo humano e apresenta importante participação na proteção contra as agressões do ambiente, impedindo a perda de fluidos corpóreos essenciais, protegendo contra correntes elétricas de baixa voltagem, forças mecânicas, e quantidades excessivas de radiação ultravioleta; na imunidade, combatendo a invasão de agentes tóxicos e de microorganismos; na regulação da temperatura corporal; como órgão dos sentidos; e, apresentando a função metabólica de sintetizar a vitamina D, em uma reação dependente de luz solar (BRINCAT; VERSI; MONIZ, 1987).

2.1.1 Envelhecimento Cutâneo

A alteração mais marcante do envelhecimento cutâneo é o aplainamento da junção dermoepidérmica com a perda do padrão em rede, uma alteração que causa uma perda da coesão na interface dermoepidérmica, e que pode ser responsável pela propensão da pele do idoso a formar bolhas e a transtornos bolhosos (DANAHY; GILCHREST, 2001).

Boussou (1973) classificou os tipos de pele de acordo com as alterações das macromoléculas de colágeno e elastina que ocorrem com o passar dos anos:

- a) O tipo 0 (zero) corresponde ao aspecto histológico observado na pele jovem e sadia.
- b) O tipo I mostra uma rarefação das fibras elásticas oxitalâmicas separadas por espaços largos em que algumas perdem a sua ancoragem com a membrana basal.
- c) No tipo II, o desaparecimento das fibras oxitalâmicas é quase completo, deixando uma faixa clara subepidérmica, atravessada por alguns feixes desorganizados de fibras colágenas.
- d) O tipo III corresponde a uma acentuação do tipo II. A faixa clara subepidérmica é mais proeminente ou menos espessa que a epiderme.

2.1.1.1 Classificação e Etiopatogenia

Uma classificação proposta por Nascimento (2002) evidencia alguns tipos de envelhecimento:

a) Envelhecimento intrínseco ou verdadeiro ou cronológico

Cronossenescência ou dermatocronossenescência cutânea é definida como o conjunto de alterações que acometem a pele difusamente, com variações topográficas regionais, como consequência natural da idade. São, portanto, comuns a todas as pessoas, embora possam ocorrer variações setoriais.

b) Envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento

Actinossenescência cutânea ou dermatoactinossenescência compreende o conjunto de alterações da pele consequentes à exposição aos raios ultravioleta do espectro solar. O aspecto é variável para cada indivíduo na dependência do grau de melanização da pele, da predisposição individual (tipo da pele) e da frequência e duração da exposição solar no decorrer da vida.

c) Senescência cutânea precoce sintomática

Compreende alterações do tipo cronossenescência ou actinossenescência que ocorrem em indivíduos portadores de estados patológicos peculiares, como por exemplo, progeria, xeroderma pigmentoso, entre outros.

2.2 COLÁGENOS

Nos seres humanos, os colágenos representam um terço do total das proteínas, sendo responsáveis por três quartos do peso sólido da pele, e são os componentes mais prevalentes da matriz extracelular (BRINCKMANN, 2005). Notavelmente, o colágeno intacto foi identificado em tecidos moles, dos ossos de um fóssil de *Tyrannosaurus rex*, de 68 milhões de anos (SCHWEITZER *et al.*, 2007; ASARA *et al.*, 2007). O colágeno é de longe, a proteína mais antiga detectada até o momento (BUCKLEY *et al.*, 2008; PEVZNER; KIM; NG, 2008).

A família de colágenos é composta por 28 membros, numerados com algarismos romanos em vertebrados (I – XXVIII), que diferem consideravelmente em tamanho, estrutura, distribuição e função tecidual, mas todos são caracterizados pela presença de domínios contínuos ou

interrompidos de tripla hélice (RICHARD-BLUM, 2011). Um novo colágeno epidérmico foi chamado de colágeno XXIX (SÖDERHÄLL *et al.*, 2007), mas Gara, Grumati e Urciuolo (2008) mostraram ser o gene *COL29A1* idêntico ao gene *COL6A5*, e a cadeia $\alpha 1$ (XXIX) corresponder à cadeia $\alpha 5$ (VI).

A tripla hélice é estabilizada pela presença de glicina, um alto teor de prolina e hidroxiprolina, ligações intercadeias de hidrogênio e interações eletrostáticas envolvendo a lisina e aspartato (FALLAS *et al.* 2009). As sequências da tripla hélice são compostas de repetições Gly-X-Y, sendo X e Y frequentemente, prolina e hidroxiprolina-4, respectivamente (RICHARD-BLUM; RUGGIERO, 2005). A tripla hélice tem a forma cilíndrica, mas ela pode ser flexível devido à presença de imperfeições de Gly-X-Y (um a três resíduos de aminoácidos) e interrupções, sendo que nas cadeias de colágeno IV podem ocorrer até 21 a 26 interrupções (KHOSHNOODI *et al.*, 2008). Essas interrupções são associadas a nível molecular, com regiões de considerável plasticidade, flexibilidade e reconhecimento molecular (BELLA *et al.*, 2006).

A diversidade da família de colágenos é ainda maior pela existência de várias cadeias α , que variam de 662 até 3.152 aminoácidos para os humanos, cadeias $\alpha 1$ (X) e $\alpha 3$ (VI) respectivamente; várias isoformas moleculares e estruturas supramoleculares para um único tipo de colágeno; e o uso de promotores e *splicing* alternativos (RICHARD-BLUM; DUBLET; VAN DER REST, 2000). Os colágenos são depositados na matriz extracelular, mas participam nas interações célula-matriz através de várias famílias de receptores, regulando a sua proliferação, migração e diferenciação. Eles têm um papel estrutural e contribuem para as propriedades mecânicas. Alguns colágenos têm uma distribuição restrita de tecido e, portanto, funções biológicas específicas (HEINO, 2007; HUMPHRIES *et al.*, 2006; LEITINGER; HOHENESTER, 2007). Os critérios para nomear uma proteína de colágeno não são bem definidos, sendo que outras proteínas que contêm um domínio tripla hélice não foram numeradas com um algarismo romano até o momento, e não pertencem à família de colágenos *stricto sensu* (FRASER; TENNER, 2008). A Tabela 1 mostra os colágenos divididos em subfamílias conforme suas montagens supramoleculares (RICHARD-BLUM, 2011)

Tabela 1 - Divisão dos Colágenos em Subfamílias

Subfamílias de Colágenos
- Colágenos que formam fibrilas: $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(II)$, $\alpha 1(III)$, $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$, $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$, $\alpha 1(XXIV)$ e $\alpha 1(XXVII)$. - Colágenos associados a fibrilas com hélices triplas interrompidas (<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i> - FACIT): $\alpha 1(IX)$, $\alpha 2(IX)$, $\alpha 3(IX)$, $\alpha 1(XII)$, $\alpha 1(XIV)$, $\alpha 1(XVI)$, $\alpha 1(XIX)$, $\alpha 1(XX)$, $\alpha 1(XXI)$ e $\alpha 1(XXII)$. - Colágenos formadores de rede: colágenos $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$, $\alpha 5(IV)$, $\alpha 6(IV)$, $\alpha 1(VIII)$, $\alpha 2(VIII)$, $\alpha 1(X)$; colágenos $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$, $\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$, $\alpha 6(VI)$, $\alpha 1(VII)$, $\alpha 1(XXVIII)$; e colágeno $\alpha 1(XXVI)$. - Colágenos de membranas: $\alpha 1(XIII)$, $\alpha 1(XVII)$, $\alpha 1(XXIII)$ e $\alpha 1(XXV)$. - Colágenos multiplexina (formadores de endostatina): $\alpha 1(XV)$ e $\alpha 1(XVIII)$.

Fonte adaptada: RICHARD-BLUM, 2011

Durante o envelhecimento ocorrem alterações na qualidade das proteínas, causadas por vários fatores, incluindo a oxidação lipídica e a glicosilação. Em proteínas de meia-vida longa, os produtos finais de glicosilação avançada que entram em reação (em inglês, *Advanced Glycosylation End-products* - AGEs), fazem ligações moleculares irreversíveis, alterando as propriedades bioquímicas das moléculas, formando ligações cruzadas. Estas inibem a atividade das proteases, que são enzimas responsáveis pela degradação das proteínas alteradas. Os AGEs acumulam-se nas proteínas da matriz extracelular durante o envelhecimento (AVERY; BAILEY, 2006).

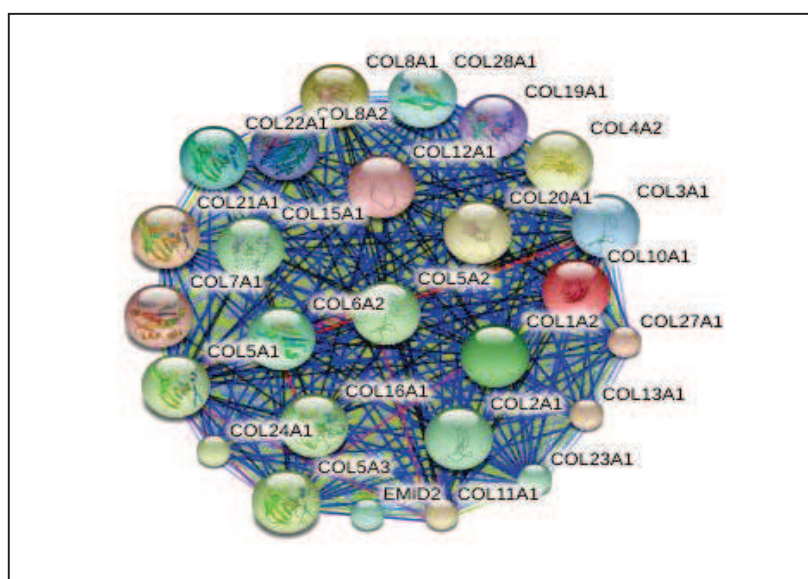
As matricriptinas de colágenos são fragmentos biologicamente ativos de moléculas que se encontra na matriz extracelular, mas não são expostas naturalmente (incluindo proteínas e carboidratos, tais como os glicosaminoglicanos). Elas permanecem ocultas até serem expostas por alterações, principalmente as estruturais. Esses fragmentos bioativos lançados por clivagem proteolítica de colágenos regulam uma série de processos fisiológicos e patológicos, tais como desenvolvimento, angiogênese, crescimento tumoral e metástase, e, reparação tecidual. As matricriptinas aumentam a diversidade funcional dos colágenos, porque a maioria possuem atividades biológicas diferentes de sua molécula de origem. Um tipo de colágeno simples pode dar origem a várias matricriptinas (colágeno IV). A maioria das matricriptinas é derivada da

membrana basal de colágenos (colágenos IV, VIII e XVIII), ou localizada na zona da membrana basal (colágenos XV e XIX), e mostram propriedades antitumorais e antiangiogênica (NYBERG; XIE; KALLURI, 2005; RICHARD-BLUM; BALLUT, 2011).

O significado do colágeno fibrilar no desenvolvimento e manutenção de vários tecidos em que são expressos é ilustrado pelo fenótipo variado, como consequências de mutações nos genes que codificam estas proteínas. A mutação no gene do colágeno tipo I causa a osteogênese imperfeita e alguns outros distúrbios do tecido conjuntivo (BYERS, 2001a); as mutações nos genes do colágeno tipo II e XI resultam em condrodisplasias (HORTON; HECHT, 2002); as formas da síndrome de Ehlers–Danlos seguem das mutações nos genes do colágeno tipo III e V (BYERS, 2001b; MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001). Várias doenças autoimunes envolvem autoanticorpos dirigidos contra colágenos. O colágeno VII é o autoantígeno da epidermólise bolhosa adquirida (ISHII *et al.*, 2010), e o colágeno XVII é um importante autoantígeno da pele na doença do penfigóide bolhoso (FRANZKE *et al.*, 2005). A cadeia $\alpha 3$ do colágeno IV contém os determinantes antigênicos reconhecidos por anticorpos antiglomerulares da membrana basal, encontrados em pacientes com síndrome de Goodpasture, caracterizada por glomerulonefrite e hemorragia pulmonar (KHOSHNOODI *et al.*, 2008). A síndrome da bronquiolite obliterante, que é a causa mais comum da falha de transplante de pulmão, está associada com uma forte resposta imune celular do colágeno V (BURLINGHAM *et al.*, 2007).

2.3 Gene *COL27A1* (*Collagen, Type XXVII, Alpha 1*)

O gene *COL27A1* é o segundo membro de um novo conjunto de genes de colágenos fibrilares, que têm maior similaridade com as sequências codificadas de genes de colágenos fibrilares menores (*COL5A1*, *COL5A3*, *COL11A1* e *COL11A2*). As relações filogenéticas mostram que os genes de colágenos fibrilares maiores (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* e *COL3A1*) foram reunidos em um grupo, junto com o gene *COL5A2*. Os genes de colágenos fibrilares menores (*COL5A3*, *COL5A1*, *COL11A1* e *COL11A2*) formaram outro grupo. E, os genes dos colágenos *COL27A1* e *COL24A1* reuniram-se em um grupo separado, sugerindo que três linhagens distintas constituem os colágenos fibrilares de vertebrados. O domínio da tripla hélice de *COL27A1* é mais curto do que o de outros colágenos fibrilares relatados, e contém 994



Fonte: <http://www.genecards.org>

O gene *COL27A1* é expresso primariamente na cartilagem, em um padrão similar com o do colágeno tipo II e XI, mas também em uma variedade de camadas de células epiteliais no desenvolvimento de tecidos, incluindo pulmão, estômago, gônadas, pele, dentes e cóclea. Ele é um excelente *locus* candidato para os distúrbios nos quais ocorrem alterações no desenvolvimento do osso, e anormalidades no olho. Estudos futuros do gene *COL27A1* deverão produzir melhor compreensão para a condrogênese normal, e, fornecer pistas para a patogênese de algumas condrodisplasias, e, distúrbios de outros tecidos nos quais este gene é expresso. Uma vez que as mutações deste gene forem identificadas, a função biológica principal deste novo gene do colágeno poderá tornar-se clara. Este gene foi nomeado de acordo com a nomenclatura tradicional de colágenos, e atribuído o próximo número disponível, *COL27A1*. Foi submetido ao

GenBank e atribuído um número de acesso: AY149237 (PACE *et al.*, 2003). A Tabela 2 mostra aspectos importantes sobre o gene *COL27A1*, e, a Figura 2 mostra a localização deste gene no cromossomo 9

Tabela 2 – O Gene *COL27A1* (*Collagen, Type XXVII, Alpha 1*)

Aspectos Importantes
- Definição: <i>collagen, type XXVII, alpha 1</i> [Homo sapiens]. - Título alternativo; símbolo: <i>KIAA1870</i>. - Localização: cromossomo 9q32-33. - Homologia: camundongo, rato. - Função: componente estrutural da matriz extracelular. - Processo: adesão celular e transporte de fosfato - Estrutura do gene: • Pace e colaboradores em 2003 identificaram que o gene <i>COL27A1</i> contém 61 exons e 156 kbp (PACE <i>et al.</i>, 2003). • Boot-Handford e colaboradores em 2003 identificaram que o gene <i>COL27A1</i> contém 56 exons e 156 kbp (BOOT-HANDFORD <i>et al.</i>, 2003).

Fonte: *GenBank of National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

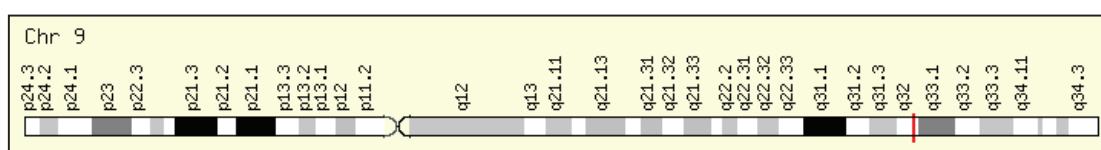


Figura 2 – A Barra Vermelha representa a localização do Gene *COL27A1* no Cromossomo 9

Fonte: <http://www.genecards.org>

O gene homólogo do rato está localizado no cromossomo 4. Este gene codifica polipeptídeos terminal amino e carboxila, similares aqueles dos colágenos fibrilares menores. A análise de expressão do gene *col27a1* do rato demonstrou alta expressão na cartilagem, nos olhos e na orelha, mas também nos pulmões e no cólon. O gene *col27a1* do rato é altamente expresso na cartilagem durante o desenvolvimento, e, continua a ser altamente abundante na cartilagem do adulto. A expressão desenvolvida deste gene na cartilagem, olhos e cápsula ótica sugere que as

mutações neste gene poderiam alterar a funções de cada um destes órgãos, e, dar início a condições sindrômicas, envolvendo todos os três. Alternativamente, conjuntos de distúrbios isolados de desenvolvimento ou integridade de visão ou audição, poderiam ter uma apresentação principal (PAIGE *et al.*, 2000).

O primeiro experimento a investigar os genes envolvidos no processo natural do envelhecimento da pele humana, por meio de hibridização em microarranjos de DNA e de amplificação quantitativa revelou a expressão diferenciada de 105 genes, em um conjunto não redundante de 2.135 clones pré-selecionados. Destes, 43 genes mostraram aumento de sua expressão, em contraste com os outros 62 genes que tiveram sua expressão diminuída. Estes resultados sugerem que o processo de envelhecimento da pele humana está conectado com a desregulação de vários processos celulares. O gene *COL27A1* é um dos genes diferencialmente expressos no envelhecimento cutâneo humano (LENER *et al.*, 2006). Na figura abaixo está a representação de isoformas de transcrição do gene *COL27A1*



Figura 3 - Exon, Intron e UTRs do Gene *COL27A1*

Fonte: <http://www.genecards.org>

2.4 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene, tal como a sequência de DNA, é processada em um produto funcional, tal como proteínas ou RNA (BRUECKNER *et al.*, 2009). Várias etapas no processo de expressão gênica podem ser moduladas, incluindo a transcrição do mRNA, e a modificação pós-traducional de uma proteína. Em genética, a expressão gênica é o nível mais fundamental, no qual o genótipo suscita o fenótipo. Tais fenótipos são frequentemente expressos pela síntese de proteínas que controlam a forma do organismo, ou que atuam como enzimas para catalisar vias metabólicas específicas, que caracterizam o organismo (SIRRI *et al.*, 2008).

2.4.1 Regulação da Expressão Gênica

A regulação da expressão gênica refere-se ao controle da quantidade e tempo de aparecimento do produto funcional de um gene. O controle da expressão é vital, proporcionando flexibilidade à célula para se adaptar a um ambiente variável (HEDGE; KANG, 2008). Normalmente a regulação gênica dá o controle da célula ao longo de toda a sua estrutura e função, sendo a base para a diferenciação celular de qualquer organismo. Ela também pode servir como substrato para mudanças evolutivas, dado que o controle do tempo, localização e quantidade de expressão podem ter um efeito profundo nas funções do gene em uma célula. Qualquer etapa da expressão do gene pode ser modulada, e a estabilidade do produto final do gene também contribui para o nível de sua expressão (ZAIDI *et al.*, 2004).

Alguns termos descrevem os genes conforme eles são regulados. Um gene constitutivo é um gene que é transcrito continuamente, em oposição a um gene facultativo que é transcrito somente quando necessário. Já um gene induzível é um gene cuja expressão é sensível a mudanças ambientais ou dependentes da posição no ciclo celular. Os genes *housekeeping* são tipicamente genes constitutivos que são transcritos em um nível relativamente constante. Os produtos do gene *housekeeping* são geralmente necessários para a manutenção da célula, e, presume-se que sua expressão é afetada por condições experimentais. Exemplos: *Beta-actin* e *GAPDH* (TAN *et al.*, 2011).

2.4.2 Quantificação da Expressão Gênica

A capacidade de quantificar o nível em que um determinado gene é expresso dentro de uma célula, tecido ou organismo pode fornecer uma quantidade enorme de informações. Por exemplo, medindo a expressão do gene pode-se identificar a infecção viral de uma célula (expressão de proteínas virais); determinar a suscetibilidade do indivíduo ao câncer (expressão do oncogene); descobrir se uma bactéria é resistente à penicilina (expressão de *beta-lactamase*). Da mesma forma, a investigação da localização de expressão da proteína é particularmente importante para o estudo do desenvolvimento em organismos multicelulares, e como um indicador de função da proteína em uma única célula. Idealmente a medição da expressão é feita

detectando o produto final do gene (para muitos genes, isso é a proteína). No entanto, muitas vezes é mais fácil detectar um dos precursores, tipicamente o mRNA, e inferir o nível de expressão do gene (SCHWANHÄUSSER *et al.*, 2011).

No campo da pesquisa básica, a PCR em Tempo Real quantitativa tem sido utilizada também para a validação de resultados de microarranjos (do inglês. *microarrays*). Esta é uma técnica de hibridização que permite a investigação da análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo. Alguns arranjos possuem todo o genoma de um organismo e podem ser utilizados para avaliar alterações da expressão gênica (transcriptoma). O método é basicamente qualitativo e não permite uma análise estatisticamente confiável e de fácil correlação. Por tal motivo a PCR em Tempo Real quantitativa é utilizada como uma técnica de apoio para validar e quantificar os genes resultantes da análise de microarranjos (DENOEUDE *et al.*, 2008).

2.4.2.1 *Fold change*

Fold change é basicamente uma razão: $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ alvo} - C_T \text{ controle}$ e $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T \text{ estimulado} - \Delta C_T \text{ controle}$. É a relação entre o valor medido para uma amostra experimental e o valor para a amostra de controle. Por exemplo, um valor inicial de 30 e um valor final de 60 correspondem a uma *fold change* de 2, ou em termos comuns, um aumento de duas vezes, indicando que a quantidade dobrou. Usada frequentemente em análise de dados de expressão de genes em microarranjo e experimento *RNA-Seq*, para medir a mudança na expressão do nível do gene (aumento ou diminuição). *Fold changes* são especificadas para garantir genes com mudança significativa, de pelo menos, uma quantidade pré-determinada. Isso significa que o valor absoluto dos níveis médios de expressão de um gene, em cada uma das duas condições, deve ser maior do que o dobro da mudança para ser chamado positivo, e, menor do que o inverso do dobro da mudança para ser chamado de negativo (TUSHER; TIBSHIRANI; CHU, 2001, ZANG *et al.*, 2007 e ZHANG, 2007).

3 ARTIGO

Analysis of *COL27A1* gene expression in the female skin aging

Iáscara Coelho dos Santos ^a, Desiree Cigaran Schuck ^b, Ruth Maria Graf ^c,
Salmo Raskin ^{a,*}

^a*Center of Biologic Sciences and of Health, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba-PR, Brazil*

^b*Laboratory of Molecular Biology (LABIM), Positivo University, Curitiba-PR, Brazil*

^c*Pietà Medical Center, Curitiba-PR, Brazil*

Highlights

- The *COL27A1* gene showed increase of expression in the female skin aging.
- There was increase of expression of this gene after menarche and menopause.
- The highest level of gene expression occurred after physiological menopause.
- These events are related to the beginning and end of the female reproductive life.
- This increase had a strong correlation with events influenced by hormonal changes.

Abstract

The human skin aging is influenced by genes on a molecular level belonging to different categories of cellular processes, which show expression changes over time. This study had with the objective research the profile of gene expression *COL27A1* (collagen, type XXVII, alpha 1) in human skin, at different stages of the female development, in order to detect changes in its level of expression, through the quantification of their messenger RNA molecules, by quantitative polymerase chain reaction in real time (RT-qPCR). Skin samples belonging to twelve female individuals were analyzed in four distinct stages of human development: the first group was composed of individuals whose sample was obtained from birth until the menarche; the second group was that of individuals between menarche and the end of the third decade of life; the third group included the period of 30 to 45 years of age; and the fourth group encompassed women after physiological menopause. The results showed a significant increase of expression of this gene after menarche and menopause (beginning and end of the reproductive life). The highest levels of expression occurred after physiological menopause. The increase in expression of the gene has had a strong correlation with events influenced by hormonal changes.

Keywords: Gene expression; Gene *COL27A1*; Skin aging

* Corresponding author. Address: Genetika- Counseling Center and Genetic Laboratory.

Saldanha Marinho Street, 1782 - Bigorrião Zip code: 80730-180. Curitiba – PR.

Tel.: +55-41-33066838; fax: +55-41-33066811. E-mail address: genetika@genetika.com.br

1. Introduction

The biological aging is a universal process which is due to a complex interaction of genetic, epigenetic, and epidemiological factors¹. Intrinsic structural changes occur as a natural consequence of aging and are genetically determined². In intrinsic human skin aging there is a set of changes that affect the skin diffusely with regional topographic variations³. Human skin is the largest multifunctional organ of the body⁴ and skin changes are among the most visible signs of aging⁵.

Collagen occurs in many places throughout the body. So far, 28 types of collagen have been identified and described⁶. Hjorten et al. (2007)⁷ demonstrated that collagen XXVII is associated with cartilage calcification, and can play a role in the transition from cartilage to bone during the genesis of the skeleton. Christiansen et al. (2009)⁸ have confirmed their participation in the genesis of the skeleton through studies with zebrafish, where this collagen plays a role in vertebral mineralization and post-embryonic axial growth.

The *COL27A1* gene was identified by Boot-Handford et al. (2003)⁹ and Pace et al. (2003)¹⁰, having been found that the product of their greater protein, pro α 1 (XXVII), is expressed by chondrocytes, but also in a variety of layers of epithelial cells in the development of tissues, including lung, stomach, gonads, skin, teeth and cochlea. This gene is approximately 156 kbp long and has 61 exons located on chromosome 9q32-33⁷.

In an experiment that investigated the genes involved in the natural aging process of human skin, performed with surgical samples from human foreskin, by cDNA microarrays and validated by real-time PCR having been shown the *COL27A1* gene increase in the level of its expression in male individuals. This study was analyzed statistically by using *t*-test and significant microarray analysis (SAM). For SAM analysis was by setting the fold-change parameter to 1.7 such that only those genes were significant that showed at least a 1.7-fold induction or repression. The gene *COL27A1* showed a fold-change of 2.288¹².

Thus, we performed this study to search the expression profile of *COL27A1* gene in the skin, at different stages of human development, in order to detect changes of its level of expression. The different stages here considered were bounded by menarche, the onset of physiological decline of the organism (the end of the third decade of life)¹³ and the menopause.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Two surgical samples were derived from each individual, both with 5 mm diameter. The samples were obtained from human skin areas of the body usually covered, not exposed to sunlight (abdomen), without detectable inflammation. These samples were leftovers of elective surgical procedures, which were placed in a solution of RNeasy Tissue Collection solution (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), a solution for stabilization of RNA that inactivates RNase immediately, thus preventing RNA degradation. After collection, the samples were stored at - 80° C until used for RNA isolation. Written consents were obtained from all subjects or their legal representatives. This study was approved in two Ethics and Research Committee (n° 0603-08 and 0003175-09). Twelve female individuals, healthy, which were between 2 and 57 years old (who had not been subjected to hormone replacement therapy, and were not smokers), were divided into 4 groups of 3 individuals each according to the different stages of the female human development:

- The first group was composed of girls, of variable age between birth to menarche (absence of pubarca and telarca);
- The second group was composed of individuals whose age ranged between menarche and the end of the third decade of life;
- The third group included individuals between the ages of 30 to 45 years of age (in women who did not provide menopause);
- The fourth group consisted of women after menopause physiological.

2.2. Methods

2.2.1. RNA isolation and analysis

Total RNA was isolated by using RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), following the manufacturer's protocol. Quantification of RNA concentration isolated was made

by absorbance reading using Nanodrop Spectrophotometer 2000 equipment (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), the Nucleic Acid-RNA option.

2.2.2. Reverse transcription

Reverse transcription (cDNA synthesis) was performed with 200 ng of total RNA isolated and quantified using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The components of the Mix were 2.0 µl of RT Buffer (10 X), 0.8 µl of dNTP Mix 100 mM (25 X), 2.0 µl of RT Random Primers (10 X), 1.0 µl Reverse Transcriptase MultiScribe™ and 4.2 L of Nuclease-free H₂O. The thermal cycler program used was 10 minutes to 25 °C, 120 minutes at 37 °C, 5 min at 85 °C, and maintenance at 4 °C, in the Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Were used as negative controls, reactions in triplicate of RT without reverse transcription, in order to assess the absence of genomic DNA levels in samples of RNA.

2.2.3. Selection of primers and probes TaqMan® for relative quantification of gene expression

The primers used for PCR in real time to the target gene (*COL27A1*) and the endogenous controls: *ACTB* (beta-actin), *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and *18S rRNA* (18S ribosomal RNA) genes, have been published previously in the GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI).

It was used the inventoried TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA): predesigned set of primers and MGB probes TaqMan®, with the marker FAM, as fluorocromo™, in one preformulated tube 20X. The final concentrations 1X are 250 nM for the probe and 900 nM for each primer. Os TaqMan® Endogenous Control Assays are included in the inventoried TaqMan® Gene Expression Assay. See Table 1

Table 1 - Assays of gene expression TaqMan® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

Gene Symbol	Availability	Assay ID
<i>COL27A1</i>	Inventoried	Hs00259829_m1
<i>ACTB</i>	Inventoried	Hs99999903_m1
<i>GAPDH</i>	Inventoried	Hs03929097_g1
<i>18S rRNA</i>	Inventoried	Hs99999901_s1

2.2.4. Real Time - PCR

Expression profile of *COL27A1* gene was analyzed by real-time PCR using the kit TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), in a reaction volume of 10 uL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X), 1,0 uL de TaqMan® Gene Expression Assay (20X), 2,0 uL of cDNA template, 7,0 uL of Nuclease-free water, in a total volume of 20 uL by reaction. All reactions were triplicate and the values are the means three independent experiments, both for the *COL27A1* gene as for three endogenous controls (genes *ACTB*, *GAPDH* e *18S rRNA*).

In the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), amplifications occurred in an initial cycle of 50 °c for 02 minutes, required for optimal activity of the UNG (uracil-N-DNA glycosylase), an enzyme that removes any previously amplified product, avoiding cross-contamination. The second stage consisted of a cycle of 95 °c for 20 s, required for the activity of AmpliTaq® Fast DNA Polymerase. In the next step were realized 40 cycles to 95 °c for 01 s, and 60 °c for 20 s. The calculations of the relative expression were performed using the comparative C_T Method by *DataAssist*™ Software v 2.2 *RQ Study Results* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e *Microsoft*® *Excel*.

2.2.5. Analysis of relative gene expression quantification

The Comparative C_T Method ($\Delta\Delta C_T$) uses arithmetic formulas, according to the model described by Plaffl (2001)¹⁴. The amount of target, standardized to endogenous reference (*GAPDH*) and in relation to the calibrator, is given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Where $\Delta\Delta C_T$ is ΔC_T (2nd group) – ΔC_T (1st group), ΔC_T (3rd group) - ΔC_T (1st group) and ΔC_T (4th group) - ΔC_T (1st group); ΔC_T is $C_{T(\text{test gene})} - C_{T(\text{control gene})}$ in the 04 groups, and C_T is the cycle in which the threshold is crossed.

3. Results

In our experiment we found mean values of fold-change of 9,430 between the first and fourth group of female human development. Between the first and second group, the average values of

fold-change were 3,782. Between the second and third group, the average values of fold-change were de-0.131. And, between the third and fourth group, the difference between the average values of fold-change was 5,778. See Table 2

Table 2 - Results of real-time PCR

Sample	Age (years)	ΔC_T	ΔC_T Average child	$\Delta \Delta C_T$	In relation to child Fold Change	Average Fold Change By age
01	02	6.153688	6.151947021	Control group	1	1
02	04	6.489441	6.151947021	Control group	1	1
03	06	5.812712	6.151947021	Control group	1	1
04	17	4.720425	6.151947021	- 1.43152	2.697311926	3.782924598
05	28	3.237587	6.151947021	- 2.91436	7.538931411	
06	29	5.998102	6.151947021	- 0.15384	1.112530458	
07	38	5.980835	6.151947021	- 0.17111	1.125926038	3.651640868
08	39	4.650272	6.151947021	- 1.50167	2.831712214	
09	40	3.345152	6.151947021	- 2.80680	6.997284352	
10	54	2.891899	6.151947021	- 3.26005	9.580147793	9.430431139
11	56	3.251341	6.151947021	- 2.90061	7.467400738	
12	57	2.660896	6.151947021	- 3.49105	11.24374489	

$\Delta \Delta C_T$ is ΔC_T (2nd group) - ΔC_T (1st group), ΔC_T (3rd group) - ΔC_T (1st group) and ΔC_T (4th group) - ΔC_T (1st group);
 ΔC_T is $C_{T(\text{test gene})} - C_{T(\text{control gene})}$ in the 04 groups;
 C_T is the cycle in which the threshold is crossed.

The results of our experiment showed a significant increase of expression of *COL27A1* gene between the first and the second stage (after menarche), and in the fourth stage (after menopause). However, no significant differences were observed between the second group (after menarche until the age of 30 years) and the third group (of 30 to 45 years of age). The highest levels of expression of this gene in the skin occurred in the fourth group (after the physiological menopause). See Figure 1:

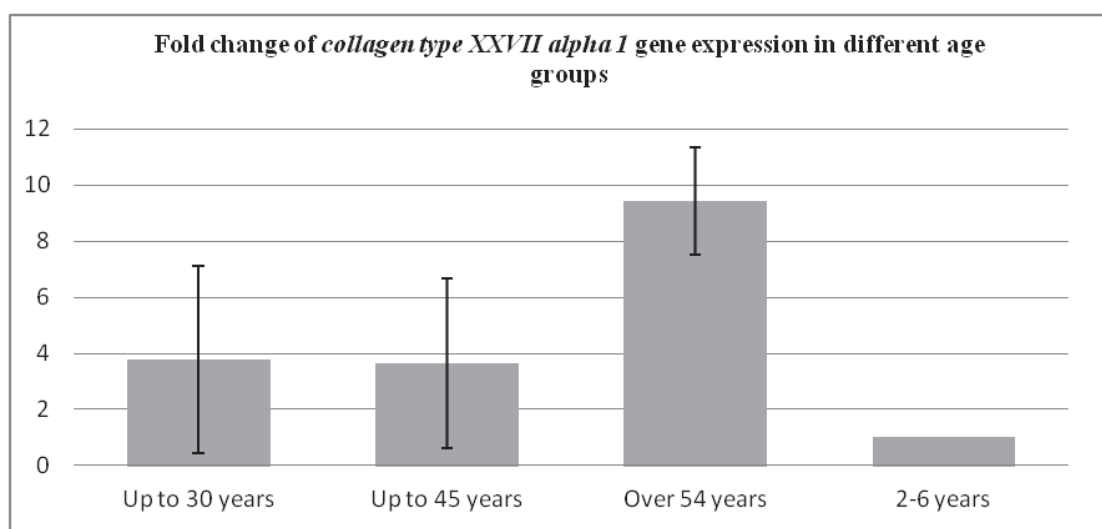


Fig. 1. Fold Change of *COL27A1* gene expression in the four stages of the female human development

4. Discussion

In the analysis of *COL27A1* gene expression in human skin, in different stages of female development, we have detected changes in aging gene expression. The research had the goal to determine whether the variability in the expression of this gene was stable during development, or if physiological events could lead to an increase or significant reduction of its expression. A first increase of the expression of this gene occurred in the second stage of human development, after menarche, and a second and more significant increase occurred in the fourth stage, after menopause. These two physiological events, menarche and menopause, are related to important hormonal changes.

The aging process is associated with significant declines in levels of many hormones and trophic factors such as estrogen, testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, growth hormone, insulin-like growth factor type 1 and melatonin. The effect of this decrease in skin is poorly documented, although there are more data available to estrogen than others hormones^{16, 17}. Hall and Phillips (2005)¹⁸ also reported that aging is associated with the decrease in the level of various hormones, including estrogen. Although even the effect of estrogen in the skin is not fully understood, the fall of estrogen levels in women is associated with a variety of skin changes.

In the four stages of the female human development analyzed, the first is represented by childhood, in which the organism presents body growth and development of organs and systems. At this stage the *COL27A1* gene expression is low. When the individual reaches sexual maturity, after menarche (the estimate of the average age of menarche is between 12 and 13 years), the level of expression of this gene increases (second stage). In adulthood the tangible growth is completed, and the event of maturity is reached. Ossification and growth are finalized shortly in the early years of this period of 21 to 25 years. After this age the changes occur very slowly; body keeps growing, except for some structures. The slowing of the metabolism is a characteristic that marks this phase as a whole¹⁹. In this stage gene expression remains constant, even when starting the physiological decline of the organism until menopause (third stage).

In the women, close to 45 years there is a reduction in follicular function. The transition between the irregular menstrual cycles and its complete cessation usually leads to 1 to 2 years. After about one year of menopause, the ovaries become fibrotic²⁰. The natural menopause is diagnosed after 12 months of amenorrhea, resulting from the permanent cessation of ovarian function. The average age of menopause is 51 years²¹. The decline of female reproductive capacity is an obvious change neuroendocrine age-dependent. Menopause and its features constitute phenotypes of aging²². The neuroendocrine system, under the influence of neurotransmitters and neuropeptides, regulating the release and inhibition of hormones secreted into the blood circulation²³. Hormones play an important role in the maintenance of integrative and trophic function of tissues, and its deficiency results in the deterioration of the function tissue²⁴.

In the study was found that after menopause occurs the largest increase of *COL27A1* gene expression, which could be related to the cessation of production of estradiol, due to ovarian failure. In a recent study of Yan et al. (2011)²⁵, where the variability of gene expression also was measured using cDNA microarray technology, investigated the role of estrogen in the modulation of the expression of genes in intrinsic aging female skin, it was demonstrated that changes in the level of estrogen play an important role in this process. This study found the involvement of another gene that encodes for collagen, *COL5A3*. Pace et al. (2003)¹⁰ showed that the gene *COL27A1* is the second member of a new set of fibrillar collagen genes, which have greater similarity in the coding sequences for smaller fibrillar collagens, as *COL5A3*.

There are few studies on the expression of genes in the skin related to menarche and menopause, and as it has not been established the main function of the gene *COL27A1*, we cannot fully understand the relationship between increased gene expression after the menarche with changes of the mentioned above hormones that are present at high levels, and the relationship with menopause, where the decline of these same hormones. One possibility is that the *COL27A1* gene expression is not influenced by hormonal stimuli, i.e. a response to secondary effects to this stimulus, but not primarily by itself. The increased expression of *COL27A1* gene could be a response from the body, trying to combat the physiological process of aging skin.

Some types of collagens are crucial to the integrity of tissues, even when they are present in very small quantities. Despite not knowing what occurs in skin aging with the synthesis of all the types of collagens in the skin, Varani et al (2006)²⁶ found that the synthesis of collagen type I and type III is reduced. As the type I is the most abundant type of collagen in the skin, the reports always describing atrophy of collagen in the skin aging. Our study suggests that this is not a rule, as we demonstrated that the type XXVII collagen is more expressed in the aged skin.

Was observed a significant increase in the level of expression of the *COL27A1* gene in the skin aging, agreeing with the study of Lener et al. (2006)¹². In this experiment were investigated genes involved in natural aging of human skin, performed with two groups of male individuals, young (3-4 years) and old (68-72 years) healthy persons, by cDNA microarray. In this research was chose to study the gene *COL27A1* because it was supposed to be differentially expressed in skin aging, and because collagen is the main protein of connective tissue in animals and the most abundant protein in mammals²⁷. The female gender was chose because studies of gene expression in tissues such as the skin, should always take into account the gender and the different stages of human development, besides, the female presents differentiated events such as menarche and menopause.

The results of this study on the profile of the *COL27A1* gene in the female skin aging have showed increase of gene expression, with two physiological events influencing this increase: the menarche, and mainly the menopause (the beginning and the end of reproductive life). Further studies will be required to find out what causes the increase of *COL27A1* gene expression, after these two physiological events, which present levels of hormone so different. Also will be essential compare our findings with similar studies in males, and with larger sampling numbers.

When the protein *COL27A1* is better characterized functionally, it will be possible that we can better understand the increase of this gene expression in human skin aging.

Acknowledgements

We thank Dr. César Cavalli Sabbaga (Pequeno Príncipe Hospital), Dr. Joel Jacobovicz (Angioplástica Clinic) and Pietà Medical Center for skin samples. This study had the financial support of the O' Boticário Group.

References

1. Montesanto, A., Dato, S., Bellizzi, D., Rose, G., Passarino, G., 2012. Epidemiological, genetic and epigenetic aspects of research on healthy ageing and longevity. *Immun Ageing* 9, 6.
2. Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., Maibach, H.I., 2008. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci.* 30, 87-95.
3. Huzaira, M., Rius, F., Rajadhyaksha, M., Anderson, R.R., González, S., 2001. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol.* 116, 846-852.
4. Wysocki, A.B., 1999. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am.* 34, 777-797.
5. Fore, J., 2006. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*, 52, 24-35.
6. Ricard-Blum, S. The Collagen Family, 2011. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(1): a004978.
7. Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R.A., Telfer, H.E., Fernandes, R.J., Krakow, D. et al., 2007. Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* 41: 535-542.
8. Christiansen, H.E., Lang, M.R., Pace, J.M., Parichy, D.M., 2009. Critical early roles for *col27alb* in zebrafish notochord morphogenesis, vertebral mineralization and post-embryonic axial growth. *PLoS One* 4: e8481.
9. Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F., Poulsom, R., 2003. A novel and highly conserved collagen (pro- α -1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J. Biol. Chem.* 278, 31067-31077.
10. Pace, J.M., Corrado, M., Missero, C., Byers, P.H., 2003. Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, *COL27A1*. *Matrix Biol.* 22, 3-14.
11. Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12960, 996-1006.
12. Lener, T., Moll, P.R., Rinnerthaler, M., Bauer, J., Aberger, F., Richter, K., 2006. Expression profiling of aging in the human skin. *Exp Gerontol.* 41, 387-397.

13. Troen, B.R., 2003. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* 70, 3-22.
14. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
15. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10, 413-417.
16. Villareal, D.T., Morley, J.E., 1994. Trophic factors in aging. Should older people receive hormonal replacement therapy? *Drugs Aging* 4, 492-509.
17. Phillips, T.J., Demircay, Z., Sahu, M., 2001. Hormonal effects on skin aging. *Clin Geriatr Med.* 17, 661-672.
18. Hall, G., Phillips, T.J., 2005. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol.* 53, 555-568; quiz 569-572.
19. Bogin, B.A., 1997. Evolutionary hypotheses for human childhood. *American Journal of Physical Anthropology* 104, 63-89.
20. Burger, H., 2008. The menopausal transition-endocrinology. *J Sex Med.* 5, 2266-2273.
21. Greendale, G.A., Lee, N.P., Arriola, E.R., 1999. The menopause. *Lancet.* 353, 571-580.
22. Wise, P.M., Krajnak, K.M., Kashon, M.L., 1996. Menopause: the aging of multiple pacemakers. *Science* 273, 67-70.
23. Muller, E.E., Cella, S.G., De Gennaro Colonna, V., Parenti, M., Cocchi, D., Locatelli, V., 1993. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J Reprod Fertil Suppl.* 46, 99-114.
24. Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Cefalu, W.T., Ingram, R.L., Bennett, S.A., Thornton, P.L., 1999. Pleiotropic effects of Growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: Inferences from moderate caloric- restricted animals. *J. Gerontology (Biol. Sci.)* 12, 521-538.
25. Yan, W., Zhao, Z., Zhang, L., Wang, D., Yan, L., Yin, N. et al., 2011. Identification of estrogen-associated intrinsic aging genes in Chinese Han female skin by cDNA microarray technology. *Biomed Environ Sci.* 24, 364-373.
26. Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E., Kang, S., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., 2006. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 168, 1861-1868.
27. Bjorksten, J., Tenhu, H., 1990. The crosslinking theory of aging--added evidence. *Exp Gerontol.* 25, 91-95.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a evolução das novas técnicas em biologia molecular foi possível realizar estudos de expressão gênica, relacionados ao processo de envelhecimento. Lerner e colaboradores em 2006 apresentaram um estudo sobre os genes envolvidos no processo de envelhecimento natural da pele humana, através da hibridização em microarranjo de DNA e amplificação quantitativa. O estudo foi realizado com amostras de pele de prepúcio humano de 10 indivíduos, sendo 05 crianças (3-4 anos) e 05 idosos (68-72 anos). Para o experimento foi usado um conjunto não redundante de 2.135 clones pré-selecionados. Os resultados mostraram que 105 genes tiveram mudança de expressão no envelhecimento da pele, sendo que 43 genes mostraram diminuição e 62 genes apresentaram aumento dos níveis de expressão. Um dos genes que apresentou aumento de expressão foi o gene *COL27A1*.

A escolha do gene *COL27A1* para este estudo, deveu-se ao fato de ser um gene diferencialmente expresso no envelhecimento cutâneo, com aumento de sua expressão. Foi também levado em conta, a importância do colágeno, o qual se constitui na principal proteína do tecido conjuntivo em animais, e é a proteína mais abundante em mamíferos. Definiu-se estudar o gênero feminino porque este apresenta eventos diferenciados já bem conhecidos, como a menarca e a menopausa. Estudos de expressão gênica em tecidos, como a pele, deveriam sempre levar em conta o gênero e as diferentes fases do desenvolvimento humano. Assim, realizou-se este estudo para pesquisar o perfil de expressão do gene *COL27A1* na pele, em diferentes fases do desenvolvimento humano feminino, avaliando as mudanças em seu nível de expressão, por meio da quantificação de suas moléculas de RNA mensageiro por qPCR. As diferentes fases aqui consideradas foram delimitadas pela menarca, pelo início do declínio fisiológico do organismo e pela menopausa fisiológica. O objetivo foi o de determinar se o aumento do nível de expressão desse gene ocorria de maneira continua durante o desenvolvimento humano, ou se algum evento determinava aumento do seu nível de sua expressão.

Essa pesquisa foi realizada com amostras de pele de 12 indivíduos do gênero feminino. (faixa de idade: 02-57 anos). Foram obtidas 02 amostras de cada indivíduo com 05 mm de

diâmetro cada. Estas amostras eram sobras de procedimentos cirúrgicos eletivos, de áreas do corpo normalmente cobertas (abdome), não expostas à luz solar. As amostras de pele não apresentavam processo inflamatório detectável. Os 12 indivíduos do gênero feminino foram divididos em quatro grupos de 03 indivíduos cada, conforme a fase do desenvolvimento humano:

- O primeiro grupo foi composto por meninas, de idade variável entre o nascimento até a menarca, com ausência de pubarca e telarca (idades: 02, 04 e 06 anos).
- O segundo grupo foi composto por indivíduos cuja idade variava entre a fase após a menarca e o final da terceira década de vida (idades: 17, 28 e 29 anos).
- O terceiro grupo incluiu indivíduos com idade entre 30 e 45 anos de idade, em mulheres que não apresentaram menopausa (idades: 38, 39 e 40 anos).
- O quarto grupo foi composto por mulheres após a menopausa fisiológica (idades: 54, 56 e 57 anos).

Os critérios de inclusão eram o de pertencer ao gênero feminino, idade dentro das fases do estudo, ausência de doenças crônico-degenerativas, ausência de Terapia de Reposição Hormonal (TRH) e ausência de tabagismo. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido de todos os indivíduos ou de seus representantes legais. Este estudo teve a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da PUCPR em 05 de dezembro de 2007 (parecer do CEP nº 0003175-09) e do Hospital Pequeno Príncipe em 28 de julho de 2008 (registro no CEP 0603-08).

As amostras foram coletadas no Hospital Pequeno Príncipe, situado à Rua Desembargador Motta, 1070, Curitiba-PR, na Clínica Angioplástica, situada à Rua Treze de Maio, 1080, Curitiba-PR e no Pietà Centro Médico, situado à Rua Solimões, 1175, Curitiba-PR. As amostras foram colocadas em solução de *RNAlater*® *Tissue Collection solution* (Applied Biosystems, USA, Carlsbad, CA), uma solução para estabilização de RNA que inativa RNase imediatamente, evitando assim a degradação do RNA. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a -80 °C no Laboratório de Biologia Molecular (LABIM), localizado na Universidade Positivo, situada à Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 530, Curitiba-PR, até serem usadas para isolamento de RNA.

O parâmetro usado no estudo de Lener *et al* (2006) para o *fold-change* foi de 1.7 vezes nas análises estatísticas, utilizando *t-test* e Análises do Significado de Microarranjos. Apenas os

genes que mostraram indução ou inibição pelo menos 1.7 vezes entre genes de crianças e de idosos foram considerados. O gene *COL27A1* obteve um resultado de *fold-change* de 2.288 vezes neste estudo. O problema é que o método é basicamente qualitativo, não permitindo uma análise estatisticamente confiável e de fácil correlação. Por tal motivo, a PCR em Tempo Real é utilizada como uma técnica de apoio, para validar e quantificar os resultados do microarranjo. Os resultados deste experimento por meio de RT-qPCR mostraram um aumento do nível de expressão do gene *COL27A1* entre a primeira e a segunda fase (após a menarca), e na quarta fase (após a menopausa). No entanto, não foram observadas diferenças entre a segunda fase (depois da menarca até a idade de 30 anos) e a terceira fase (dos 30 aos 45 anos de idade). Os maiores níveis de expressão deste gene ocorreram na quarta fase (após a menopausa fisiológica).

O processo de envelhecimento está associado com declínios significativos nos níveis de muitos hormônios e fatores tróficos como estrogênio, testosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, hormônio do crescimento, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e melatonina. Existem mais dados disponíveis sobre o efeito da diminuição na pele do estrogênio do que para os outros hormônios. Até o momento poucos estudos sobre a expressão de genes na pele relacionados à menarca e a menopausa foram realizados. Como ainda não foi estabelecida a principal função do gene *COL27A1*, não podemos afirmar a relação entre o aumento da expressão desse gene após a menarca com as alterações dos hormônios presentes em altos níveis, e nem em relação com a menopausa, onde há declínio destes mesmos hormônios. Uma possibilidade é que a expressão do gene *COL27A1* seja influenciada por resposta a efeitos secundários a estímulo hormonal, mas não primariamente por ele próprio. O aumento da expressão do gene *COL27A1* poderia ser uma resposta do organismo, tentando combater o processo fisiológico de envelhecimento da pele.

5 CONCLUSÃO

Na análise do perfil do gene *COL27A1* no envelhecimento cutâneo do gênero feminino, observou-se aumento do nível de expressão deste gene, estando este aumento associado com dois eventos fisiológicos: a menarca, e principalmente a menopausa (no início e no final da vida reprodutiva). Estudos futuros serão necessários para identificar o que determina este aumento da expressão do gene *COL27A1* após esses dois eventos fisiológicos, em que os níveis de hormônios são tão diferentes. Será fundamental também comparar os achados com estudos similares no gênero masculino, e, com números amostrais maiores. Quando a proteína *COL27A1* estiver mais bem caracterizada funcionalmente, é possível que possamos compreender melhor o aumento dessa expressão do gene no envelhecimento da pele humana.

REFERÊNCIAS

- AAROSON, S. A. **Growth factors and cancer.** Science 254: 1146-1153, 1991.
- ABBOTT, M. H.; MURPHY, E. A.; BOLLING, D. R. *et al.* **The familial component in longevity, a study of offspring of nonagenarians. II. Preliminary analysis of the completed study.** Johns Hopkins Med. J. 134(1): 1-16, 1974.
- ASARA, J. M.; SCHWEITZER, M. H.; FREIMARK, L. M. *et al.* **Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry.** Science. 316: 280–285, 2007.
- EVERY, N. C.; BAILEY, A. J. **The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen.** Pathol Biol 54: 387–395, 2006.
- BACHELARD, G. **A filosofia do não.** In: Os Pensadores. Rio de Janeiro, p.166, 1974.
- BELLA, J.; LIU, J.; KRAMER, R. *et al.* **Conformational effects of Gly-X-Gly interruptions in the collagen triple helix.** J Mol Biol 362: 298–311, 2006.
- BOOT-HANDFORD, R. P., TUCKWELL, D. S., PLUMB, D. A. *et al.* **A novel and highly conserved collagen (pro- α -1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family.** J. Biol. Chem. 278: 31067-31077, 2003.
- BOUKAMP, P. **Skin aging: a role for telomerase and telomere dynamics?** Curr, Mol. Med. 5, 171-177, 2005.
- BOUSSOU, L. Cutaneous Aging. Its relation with arteriosclerosis and atheroma. In ROBERT L, ROBERT B. (eds) **Aging of Connective Tissues skin front.** Matrix Biol. Vol I. Bâle: Karger 190-211, 1973.
- BRINCAT, M.; VERSI, E.; MONIZ, C. F. **Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy.** Obstet. Gynecol. 70: 123-7, 1987.
- BRINCKMANN, J. **Collagens at a glance.** Top. Curr. Chem. 247: 1-6, 2005.
- BRUCKNER-TUDERMAN, L.; SCNYDER, U. W.; WINTERHALTER, K. H. **Tissue form of type VII collagen from human skin and dermal fibroblasts in culture.** Eur. J. Biochem. 165: 607-611.
- BUCKLEY, M.; WALKER, A.; HO, S.Y.W. *et al.* **Comment on Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry.** Science 319: 333, 2008.
- BURLINGHAM, W. J.; LOVE, B.B.; JANKOWSKA-GAN, E. *et al.* **IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants.** J. Clin. Invest. 117: 3498-3506.

BYERS, P. H. Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S. *et al.* (Eds.), **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. McGraw-Hill, New York, pp. 5241–5286, 2001.

BYERS, P. H. **Folding defects in fibrillar collagens**. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 356, 151–157. Discussion 157–158, 2001.

CARVALHO, C.V.; PAYÃO, S.L.M.; SMITH, M.A.C. **DNA methylation, ageing and ribosomal genes activity**. Biogerontology 1:357-361, 2000.

COMAI, L.; LI, B. **The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis**. Mech Ageing Dev. 125(8): 521-528, 2004.

DANAHY, J. F.; GILCHREST, B. A. Dermatologia Geriátrica. In: GALLO, J. J.; BUSBY-WHITEHEAD, J.; RABINS, P. V.; SILLIMAN, R. A.; MURPHY, J. B. (Eds), **Reichel Assistência ao Idoso: Aspectos Clínicos do Envelhecimento**. Rio de Janeiro; cap. 38: 384-392, 2001.

DENOEUD, F.; AURY, J. M.; DA SILVA, C. *et al.* **Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing**. Genome Biol. 9: R175, 2008.

FALLAS, J. A.; GAUBA, V.; HARTGERINK, J. D. **Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions**. J Biol Chem 284: 26851–26859, 2009.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P. *et al.* **Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review**. Int. J. Cosmet. Sci. 30, 87-95, 2008.

FARAGHER, R. G. A.; KILL, I. R.; HUNTER, J. A. A. *et al.* **The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division ‘counting’ gene**. Proc. Nat. Acad. Sci. 90: 12030-12034, 1993.

FINCH, C. E.; FELICIO, L. S.; MOBBS, C. V. *et al.* **Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging process in female rodents**. Endocr. Ver. 5: 467, 1984.

FORE, J. **A review of skin and the effects of aging on skin structure and function**. Ostomy Wound Manage, 52, 24-35, 2006.

FRANZKE, C. W.; BRUCKNER, P.; BRUCKNER-TUDERMAN, L. **Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology**. J Biol Chem 280: 4005–4008, 2005.

FRASER, D. A.; TENNER, A. J. **Directing an appropriate immune response: the role of defense collagens and other soluble pattern recognition molecules**. Curr Drug Targets 9: 113–122, 2008.

GARA, S. K.; GRUMATI, P.; URCIUOLO, A. **Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain.** J Biol Chem 283: 10658–10670, 2008.

GENBANK OF NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) - [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

GUDEMUNDSSON, H.; GUDBJARTSSON, D. F.; KONG, A. *et al.* **Inheritance of human longevity in Iceland.** Europ. J. Hum. Genet. 8: 743-749, 2000.

HAYFLICK, L. **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** Exp. Cell Res. 37: 614-636, 1965.

HEGDE, R. S.; KANG, S. W. **The concept of translocational regulation.** J. Cell Biol. 182 (2): 225–232, 2008.

HEINO, J. **The collagen family members as cell adhesion proteins.** Bioessays 29: 1001–1010, 2007.

HERSKIND, A. M.; MCGUE, M.; HOLM, N. V. *et al.* **The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900.** Hum. Genet. 97: 319-323, 1996.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G. *et al.* **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Bio/Technology 11, 1026-1030, 1993.

HJELMBORG, J. VB., IACHINE, I., SKYTTE, A. **Genetic influence on human life span and longevity.** Hum. Genet. 119: 312-321, 2006.

HORTON, W. A.; HECHT, J. T. Chondrodysplasias: disorders of cartilage matrix proteins. In: ROYCE, P.; STEINMANN, B. (Eds.), **Connective Tissue and its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects.** Wiley-Liss, Inc, New York, pp. 909–937, 2002.

[HTTP://WWW.GENECARDS.ORG](http://www.genecards.org)

HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M. J. **Integrin ligands at a glance.** J. Cell Sci. 119: 3901-3903, 2006. ISHII, N.; HAMADA, T.; DAINICHI, T. *et al.* **Epidermolysis bullosa acquisita: What's new?** J Dermatol 37: 220–230, 2010.

ISHII, N.; HAMADA, T.; DAINICHI, T. *et al.* **Epidermolysis bullosa acquisita: What's new?** J. Dermatol. 37: 220–230, 2010.

KAPPELER, L.; EPELBAUM, J. **Biological aspects of longevity and ageing.** Rev. Epidemiol. Saint Publique 53(3): 235-41, 2005.

KHOSHNOODI, J.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. G. **Mammalian collagen IV.** Microsc Res Tech 71: 357–370, 2008.

- LEITINGER, B.; HOHENESTIER, E. **Mammalian collagen receptors.** *Matrix Biol.* 26: 146-155.
- LENER, T.; MOLL, P.R.; RINNERTHALER, M. *et al.* **Expression profiling of aging in the human skin.** *Exp. Gerontol.* 41, 387-397, 2006.
- MARTIN, G. M.; SPRAGUE, C. A.; EPSTEIN, C. J. **Replicative lifespan of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype.** *Lab. Invest.* 23: 86, 1970.
- McGUE, M.; VAUPEL, J. W.; HOLM, N. *et al.* **Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870-1880.** *J. Gerontol.* 48: B237-B244, 1993.
- MONTESANTO, A.; DATO, S.; BELLIZZI, D. *et al.* **Epidemiological, genetic and epigenetic aspects of research on healthy ageing and longevity.** *Immun Ageing* 9, 6, 2012.
- MORGAN, H. D.; DEAN, W.; COLKER, H. A. *et al.* **Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues implications for epigenetic reprogramming.** *J. Biol. Chem.* 279 (50): 52353-52360, 2004.
- MULLER, E. E., CELLA, S. G., DE GENNARO COLONNA, V. *et al.* **Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals.** *J Reprod Fertil Suppl.* 46, 99-114, 1993.
- MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. **Collagens and collagen-related diseases.** *Ann. Med.* 33, 7-21, 2001.
- NASCIMENTO, L. V. **Envelhecimento Cutâneo.** *Tratado de Geriatria e Gerontologia.* Rio de Janeiro; cap. 84: 708-711, 2002.
- NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. **Endogenous inhibitors of angiogenesis.** *Cancer. Res.* 65: 3967-3979.
- PACE, J. M.; CORRADO, M.; MISSERO, C. *et al.* **Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1.** *Matrix Biology* 22, 3-14, 2003.
- PAIGE, A. J.; KIERNAN, B. W.; VARELA, A. *et al.* **A deletion on chromosome 4 cosegregates with the whirler deafness mutation: exclusion of Orm1 as a candidate.** *Mamm. Genome* 11, 51-57, 2000.
- PAPALÉO NETTO, M.; BORONOV, N. **Biologia e Teorias do Envelhecimento.** *Gerontologia, São Paulo*, cap. 4: 44-59, 2002.
- PEARL, R.; PEARL, R. W. **The Ancestry of the Long-Lived.** Baltimore: Johns Hopkins Press (pub.) 1934.
- PERLS, T. T., WILMOTH, J., LEVENSON, R. *et al.* **Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 8442-8447, 2002.

- PEVZNER, P.A.; KIM, S.; NG, J. **Comment on Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry.** *Science* 321: 1040, 2008.
- RICHARD-BLUM, S.; DUBLET, B.; van der REST, M. **Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, XX, XXII, XXIV, XVI and XIX. Protein Profile Series.** Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
- RICHARD-BLUM, S.; RUGGIERO, F. **The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.** *Pathol Biol* 53: 430-444, 2005.
- RICARD-BLUM, S. **The Collagen Family.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a004978, 2011.
- RICHARD-BLUM, S.; BALLUT, L. **Matricryptins from collagens and proteoglycans.** *From Biosci* 16: 674-697, 2011.
- SCHWANHÄUSSER, B.; BUSSE, D.; DITTMAR, G. *et al.* **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature* 473 (7347): 337–342, 2011.
- SCHWEITZER, M. H.; SUO, Z.; AVCI, R. *et al.* **Analyses of soft tissue from Tyrannosaurus rex suggest the presence of protein.** *Science.* 316: 277–280, 2007.
- SHIMAMOTO, A.; SUGIMOTO, M.; FURUICHI, Y. **Molecular biology of Werner syndrome.** *Int. J. Clin. Oncol.* 9 (4): 288-298, 2004.
- SIRRI, V.; URCUQUI-INCHIMA, S.; ROUSSEL, P. **Nucleolus: the fascinating nuclear body.** *Histochem. Cell Biol.* 129 (1): 13–31, 2008.
- SÖDERHÄLL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T. *et al.* **Variants in a novel epidermal collagen gene (*COL29A1*) are associated with atopic dermatitis.** *PLoS Biol.* 5 (9): 242, 2007.
- SONNTAG, W.E., LYNCH, C.D., CEFALU, W.T. *et al.* **Pleiotropic effects of Growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: Inferences from moderate caloric- restricted animals.** *J. Gerontology (Biol. Sci.)* 12, 521-538, 1999.
- SZYF, M. **The dynamic epigenome and its implications in toxicology.** *Toxicol. Sci.* 100 (1): 7-23, 2007.
- TAKUBO, K.; IZUMYAMA-SHIMOMURA, N.; HONMA, N. *et al.* **Telomere lengths are characteristic in each human individual.** *Exp. Gerontol.* 37, 523-531, 2002.
- TAN, S. C.; CARR, C. A.; YEOH, K. K. *et al.* **Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditional under hipóxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors.** *Mol. Biol. Rep.* 39 (4): 4857-4867.
- TAYLOR, R. C.; DILLIN, A. **Aging as an event of proteostasis collapse.** *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 3 (5), 2011.

TROEN, B.R. **The biology of aging.** Mt. Sinai J. Med. 70, 3-22, 2003.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 5116–5121, 2001.

WEINBERG, R. A. **Tumor suppressor genes.** Science 254: 1138-1146, 1991.

WISE, P. M; KRAJNAK, K. M; KASHON, M. L. **Menopause: the aging of multiple pacemakers.** Science 273: 67-70, 1996.

WYSOCKI, A.B. **Skin anatomy, physiology, and pathophysiology.** Nurs. Clin. North Am. 34, 777-797, 1999.

ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; CHOI, J. Y. *et al.* **Intranuclear trafficking: organization and assembly of regulatory machinery for combinatorial biological control.** J. Biol. Chem. 279 (42): 43363–43366, 2004.

ZANG, S., GUO, R, ZHANG L, Y, LU. **Integration of statistical inference methods and a novel control measure to improve sensitivity and specificity of data analysis in expression profiling studies.** Journal of Biomedical Informatics 40: 552–560, 2007.

ZHANG, S. **A comprehensive evaluation of SAM, the SAM R-package and a simple modification to improve its performance.** BMC Bioinformatics 8: 230, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
PUCPR

ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DE
SERES HUMANOS DO HPP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____

RG nº _____, estou sendo convidada a participar de um estudo denominado: “Análise da Expressão do Gene COL27A1 no Envelhecimento Cutâneo Feminino”. O perfil de expressão do gene COL27A1 (*Collagen, Type 27, Alpha-1*) será analisado a partir de sobras de pele humana de procedimentos cirúrgicos eletivos, de áreas do corpo normalmente cobertas, não expostas à luz solar. Serão obtidas duas amostras de cada indivíduo, apresentando 05 mm de diâmetro cada.

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade. Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, nem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são o professor Doutor Salmo Raskin (fone: 3306-6838) e a aluna de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado) Iáscara Coelho dos Santos (fone: 9968-9465) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com quem poderei manter contacto pelos telefones citados. Estão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li este termo e compreendi a natureza e o objetivo da pesquisa ao qual fui convidada. Concordo, voluntariamente em participar deste estudo, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou de seu representante legal

Assinatura dos pesquisadores

Curitiba, ____ de _____ de 20__



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003175/09**

Protocolo CEP Nº **2182**

Título do projeto **Análise da expressão do gene COL27A1 no envelhecimento cutâneo feminino**

Grupo **III**
Versão **1**

Protocolo CONEP
Instituição

Pesquisador responsável **Iáscara Coelho dos Santos**

Objetivos

Avaliar o perfil de expressão do gene COL27A1 (Collagen, Type 27, Alpha-1), em diferentes fases do desenvolvimento do sexo feminino, visando detectar mudanças em sua expressão no envelhecimento cutâneo, através da quantificação de suas moléculas de RNA mensageiro por qRT-PCR.

Comentários e considerações

Trata-se de verificar a expressão de genes, através de técnicas de biologia molecular, usando como material, sobre tecidos retirados de cirurgias eletivas, às quais os sujeitos da pesquisa tem que ser submetidos.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

Adequado e redigido em linguagem compreensível.

Recomendações

Modificar os critérios de exclusão, listando as condições pelas quais um sujeito pode ter os seus dados excluídos (desconsiderados) do estudo.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **05/12/2007**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado com recomendações**.



Parecer Nº **0003175/09**

Título do projeto **Análise da expressão do gene COL27A1 no envelhecimento cutâneo feminino**

Protocolo CONEP

Instituição

Pesquisador responsável **Iáscara Coelho dos Santos**

Protocolo CEP Nº **2182**

Grupo **III**

Versão **1**

Situação Aprovado com recomendações

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Somentamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 05 de Dezembro de 2007.


Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUCPR





Curitiba, 21 de agosto de 2008.

Iáscara Coelho dos Santos
Pesquisadora Responsável

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado **Análise da expressão do gene COL27A1 no envelhecimento cutâneo feminino**, registro no CEP 0603-08, avaliado em reunião plenária em 28 de julho de 2008, chegou-se ao seguinte parecer: **foi aprovado** e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP relatórios trimestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador em caso de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Atenciosamente

Prof. Dr. Luiz Antonio Munhoz da Cunha
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa de Seres Humanos - HPP



ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR DE PROTEÇÃO À INFÂNCIA DR. RAUL CARNEIRO
Hospital Pequeno Príncipe / Hospital de Crianças César Pernetta / Faculdades Pequeno Príncipe / Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Rua Desembargador Motta, 1070 • Curitiba, PR, Brasil • CEP 80.250-060 • tel.: + 55 41 3310.1010 • fax: + 55 41 3225.2291 • info@hpp.org.br
www.pequenoprincipe.org.br • CNPJ: 76.591.569/0001-30 / Inscrição Estadual: isento / Inscrição Municipal: 5.002.035.943-2

Cód. 082 - BAG