

Citoqueratinas*

*Cytokeratins**

Hiram Larangeira de Almeida Jr.¹

Resumo: As citoqueratinas (CQ) são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, pertencendo aos filamentos intermediários; sua distribuição é específica para cada subtipo de epitélio, permitindo que sejam utilizadas como importantes marcadores de sua diferenciação. Anticorpos monoclonais permitem sua localização nos tecidos e são utilizados no diagnóstico de tumores. Na última década inúmeras mutações foram descritas em seus genes, levando a alteração em sua estrutura molecular, esclarecendo várias enfermidades cutâneas, como epidermólise bolhosa simples (CQ 5 ou 14), hiperqueratose epidermolítica (CQ 1 ou 10), hiperqueratose palmoplantar epidermolítica (CQ 9) e paquioníquia congênita (CQ 6, 16 ou 17).

Palavras-chave: citoqueratinas; imuno-histoquímica; genética molecular; mutação.

Summary: *Cytokeratins (CK) belong to the intermediate filament group and are expressed in epithelial cells. Their expression is tissue specific and for this reason they are the most important markers of epithelial differentiation. Monoclonal antibodies, which specifically mark one CK, are used in the diagnosis of many tumors. In the last decade, several mutations were described in CK genes, which lead to structural changes in its molecule. As a result, the pathogenesis of many skin diseases has been clarified, such as Epidermolysis bullosa simplex (CK 5 or 14), Epidermolytic hyperkeratosis (CK 1 or 10), Epidermolytic palmoplantar keratoderma (CK 9) and Pachyonychia congenita (CK 6, 16 or 17).*

Key-words: *cytokeratin; immunohistochemistry; molecular genetics; mutation;*

As citoqueratinas (CQ) são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, por isso também denominadas queratinas epiteliais ou queratinas moles, e devem ser diferenciadas das tricoqueratinas, as chamadas queratinas duras, as quais formam a haste do cabelo e a unha.¹

O citoesqueleto, uma rede protéica intracelular, é constituído pelos chamados filamentos intermediários, os quais medem de sete a 10nm; pelos filamentos de actina, de cerca de 7nm; e pelos microtúbulos, que medem 25nm.² Os microtúbulos estão relacionados com o transporte intracelular de organelas, os filamentos de actina participam da motilidade celular, e os filamentos intermediários dão a estrutura tridimensional da célula.²

Três subclasses de filamentos intermediários são reconhecidas: vimentina e relacionados (vimentina presente nas células mesenquimais, desmina nos miócitos e proteínas gliais nas células neurogliais); neurofilamentos (presentes nos neurônios); e por fim as citoqueratinas, encontradas nos epitélios e estruturas deles derivadas.²

Cytokeratins (CK) are components of the cytoskeleton of epithelial cells and as a consequence are also denominated epithelial keratin or soft keratin, and should be differentiated from the trichokeratins, or the so-called hard keratin, which form the hair shaft and nails.¹

The cytoskeleton is an intracellular proteic network, constituted by intermediate filaments, which measure from seven to 10 nm in thickness; by actin filaments, of about 7 nm; and by the microtubules, that measure 25 nm.² The microtubules are related to the intracellular transport of organelles, the actin filaments participate in the cellular mobility, and intermediate filaments provide the three-dimensional cell structure.²

Three subclasses of intermediate filaments have been defined: vimentin and related (vimentin present in the mesenchymal cells, desmins in the myocytes and glial proteins in the neuroglial cells); neurofilaments (present in the neurons); and finally the cytokeratins, found in the epithelia and structures derived from them.²

Recebido em 11.12.2003. / Received in December, 11th of 2003.

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 27.01.2004. / Approved by the Editorial Council and accepted for publication in January 27th of 2004.

* Trabalho realizado na Universidade Federal e Católica de Pelotas. / Work done at "Universidade Federal e Católica de Pelotas".

¹ Professor Adjunto de Dermatologia, Universidade Federal de Pelotas e do Mestrado de Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas. / Adjunct Professor of Dermatology, Universidade Federal de Pelotas and of the Masters degree course in Health and Behaviour, Universidade Católica de Pelotas.

Os filamentos intermediários são capazes de se autopolimerizar, formando uma rede citoplasmática responsável pela resistência mecânica das células, sendo, no caso dos epitélios, importante contra os traumas banais que sofrem.^{3,4}

As CQ foram catalogadas a partir de eletroforese bidimensional⁵ a qual separa as proteínas não só por seu peso molecular, mas também em função do pH. Com essa técnica observou-se que o padrão obtido nessa eletroforese variava se, por exemplo, fosse realizada a partir de lisado epidérmico ou folicular (Figura 1). Atualmente elas são divididas em dois grupos: as do tipo I, ácidas, incluindo as CQ de 9 a 23, e as do tipo II, básicas, CQ de 1 a 8.⁴

As CQ perfazem o maior grupo dos filamentos intermediários, sendo, atualmente, descritas mais de 20 diferentes, e são de extrema importância para a compreensão de vários mecanismos nas doenças cutâneas.

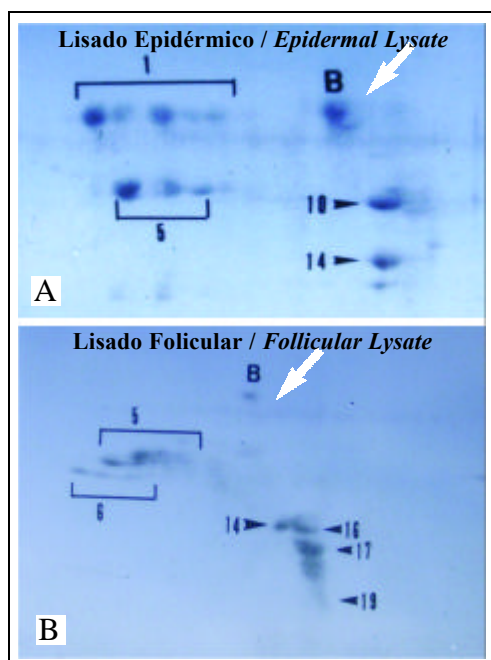
De forma semelhante, as tricoqueratinas também são divididas em dois grupos, tendo sido convencionado chamar as do grupo I de hHa1 a hHa8 (de *human Hair acidic*) e as do grupo II de hHb1 a hHb6 (de *human Hair basic*), de acordo com sua localização na eletroforese bidimensional.⁶

Mais recentemente quatro diferentes variantes da CQ 6 foram descritas na bainha radicular interna e denominadas K6irs1 (de *inner root sheath*), K6irs2, K6irs3 e K6irs4;^{7,8} outras variantes, denominadas 6a e 6b, têm distribuição diferente nos anexos cutâneos, sendo responsáveis por variabilidade clínica em algumas doenças (veja mutações).⁹

Sua importância na patogenia de diversas dermatoses deve-se à especificidade da expressão das CQ de acordo com o epitélio envolvido, por exemplo, a epiderme ou o epitélio da córnea, e também porque elas podem ser expressas somente em alguns setores dos epitélios.

Na maioria das vezes, são encontradas aos pares (Tabela 1), formando heterodímeros, ou seja, a união de duas CQ diferentes, constituindo filamentos, os quais são a estrutura tridimensional formadora do citoesqueleto, e ancoram-se nos desmossomas e na placa interna dos hemidesmossomas.

Figura 1: Eletroforese bidimensional de material citoplasmático a partir de lisado epidérmico (a) e lisado folicular (b). A distribuição das proteínas é diferente no gel, sendo B (seta) marcador onhecido idêntico em ambas. As citoqueratinas 5 e 14 são encontradas em ambos os lisados.



Most of the time, they are found in pairs (Table 1), forming heterodimers, or in other words, the union of two different CK, constituting filaments, which are the three-dimensional structure forming the cytoskeleton, and are anchored in the desmosomes and in the internal plaque of the hemidesmosomes.

Figure 1: Two-dimensional electrophoresis of cytoplasmic material starting from epidermal lysate (a) and follicular lysate (b). The distribution of the proteins is different in the gel, and B (arrow) is a known marker identical in both. Cytokeratins 5 and 14 are found in both lysates.

The intermediate filaments are capable of autopolymerization, forming a cytoplasmatic network responsible for the mechanical strength of the cells, and in the case of the epithelia, are important against eventual simple trauma.^{3,4}

CK have been classified through two-dimensional electrophoresis,⁵ which separates the proteins not only by their molecular weight, but also on the account of pH. Using this technique it was observed that the pattern obtained in the electrophoresis varied, for instance, if it was performed using epidermal or follicular lysate (Figure 1). They are currently divided into two groups: type I that are acid and include CK from 9 to 23; and type II that are alkaline, comprising CK from 1 to 8.⁴

The CK constitute the largest group of intermediate filaments, with over 20 different types described to date, and they are of extreme importance for understanding various mechanisms in cutaneous diseases.

Likewise, the trichokeratins are also divided into two groups, denominated according to convention as group I from hHa1 to hHa8 (human Hair acidic) and group II from hHb1 to hHb6 (human Hair basic), according to their location in the two-dimensional electrophoresis.⁶

More recently, four different variants of CK 6 have been described in the inner root sheath (IRS) and denominated K6irs1, K6irs2, K6irs3 and K6irs4;^{7,8} other variants, denominated 6a and 6b, have a different distribution in the cutaneous annexes, and are responsible for the clinical variability of certain diseases (see mutations).⁹

Their importance in the pathogenesis of several dermatoses is due to the specificity of the expression of CK according to the epithelium involved, for instance, the epidermis or the corneal epithelium, and also because they can be expressed only in certain sectors of the epithelia.

Tabela 1: Principais citoqueratinas com sua distribuição tecidual e as enfermidades descritas com mutações de seus genes. / Table 1: Main cytokeratins with their tissular distribution, and the illnesses described with mutations of their genes.

Localização <i>Localization</i>	Citoqueratinas <i>Cytokeratins</i>	Enfermidade por Mutação <i>Disease due to Mutation</i>
Camada Basal da Epiderme <i>Epidermal Basal Layer</i>	5 e 14 <i>5 and 14</i>	Ep. Bolhosa Simples <i>Ep. Bullosa Simplex</i>
Camadas Suprabasais da Epiderme <i>Suprabasal Layers of the Epidermis</i>	1 e 10 <i>1 and 10</i>	Hiperq. Epidermolítica <i>Epidermolytic Hyperkeratosis.</i>
Epiderme Suprabasal Palmo-Plantar <i>Palmoplantar Suprabasal Epidermis</i>	1 e 9 <i>1 and 9</i>	Hip. Palmo-Plantar Epidermolítica <i>Palmoplantar Epidermolytic Hyp.</i>
Bainha Rad. Externa, Mucosa Oral, anexos, leito ungueal <i>Outer Root Sheath, Oral Mucosa, unguial bed, annexes</i>	6a, 6b, 16 <i>6a, 6b, 16</i>	Paquioníquia Cong. <i>Pachyonychia congenita</i>
Camada Exterior da Bainha Rad. Ext. <i>External Layer of Outer Root Sheath</i>	19 <i>19</i>	— —
Córnea <i>Cornea</i>	3 e 12 <i>3 and 12</i>	Distrofia Corneana <i>Corneal Dystrophy</i>
Epitélios Simples <i>Simple Epithelia</i>	8 e 18 <i>8 and 18</i>	Cirroze criptogênica <i>Cryptogenic Cirrhosis</i>
Outros Epitélios Estratificados <i>Other stratified epithelia</i>	4 e 13 <i>4 and 13</i>	White Sponge Nevus <i>White Sponge Nevus</i>
Leito ungueal, anexos <i>Ungual bed, annexes</i>	17 <i>17</i>	Paquioníquia Cong. Esteatocistoma mult. <i>Pachyonychia congenita Steatocystoma multiplex.</i>
Célula de Merkel <i>Merkel's Cell</i>	20 <i>20</i>	— —

DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL ESPECÍFICA

As CQ têm distribuição característica de cada epitélio e seus anexos.

Na epiderme, por exemplo, elas podem ter uma expressão basal (Figura 2) - onde são encontradas as CQ 5 e 14 -, ou suprabasal - CQ 1 e 10. No folículo piloso são encontradas as CQ basais e as CQ hiperproliferativas - 6, 16 e 17-, assim chamadas por também serem encontradas em situações patológicas, como na epiderme da psoríase e em tumores. A CQ 19 é encontrada na camada mais externa da bainha radicular externa, também denominada camada basal dessa bainha, sendo mais específica do folículo piloso (Figura 3). O setor folicular acima da glândula sebácea expressa as mesmas CQ da epiderme.

Outros epitélios como os simples, a córnea e os estratificados não queratinizantes têm também seu padrão de CQ (Tabela 1).

SPECIFIC TISSULAR DISTRIBUTION

CK have a characteristic distribution in each epithelium and its annexes. In the epidermis, for instance, they can have a basal expression (Figure 2) - CK 5 and 14 - or suprabasal - CK 1 and 10. In the hair follicle basal CK and hyperproliferative CK are found - CK 6, 16 and 17 - they received this denomination as they are also found in pathological situations, such as in the epidermis of psoriasis and in tumors. CK 19 is found in the outermost layer of the outer root ar sheath, also denominated the basal layer of this sheath, this being more specific to the hair follicle (Figure 3). The follicular section above the sebaceous gland expresses the same CK as the epidermis.

Other epithelia, such as the simple, corneal and the stratified non-keratinizing also have their form of CK (Table 1).

Figura 2: Padrão epidérmico das citoqueratinas, com distribuição suprabasal (a) e basal (b), com a técnica imuno-histoquímica de Apaap a qual cora em vermelho as células positivas

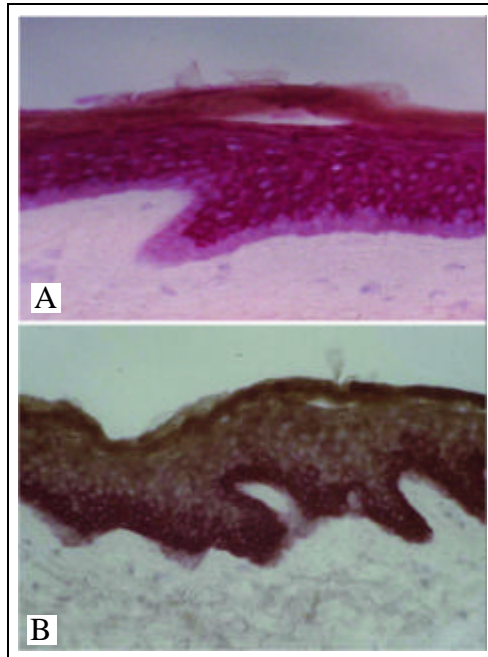


Figure 2: Epidermal pattern of the cytokeratins, with suprabasal (a) and basal (b) distribution, with the technique of APAAP immunohistochemistry which stains the positive cells red.

Dessa forma é possível falar em padrões folicular e epidérmico da distribuição das CQ. Esses padrões específicos permitem que as CQ sejam utilizadas como importantes marcadores de diferenciação epitelial.

Como já relatado acima, a CQ 6 e a CQ 16 são expressas na epiderme em situações em que ocorre hiperproliferação, como na psoríase e em tumores epiteliais, sendo por isso também chamadas de CQ hiperproliferativas. Já foi demonstrada a indução experimental da CQ 6, quando estimulada a epiderme por citoquinas, como interferon gama, fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de necrose tumoral (TNF), bem como pela radiação ultravioleta, sendo que esta última induz também a CQ 19, mostrando aspectos dinâmicos na expressão das CQ.^{10,11}

Todas as CQ têm uma molécula semelhante, constituída por quatro segmentos helicoidais - 1A, 1B, 2A e 2B - intercalados por segmentos curtos não helicoidais, chamados de segmentos ligantes L1, L12 e L2. Na extremidade encontram-se os segmentos variáveis V1 e V2, sendo que as CQ básicas apresentam segmentos H1 e H2 entre os helicoidais e os variáveis^{4,9,12} (Figura 4). Apesar dessa grande semelhança, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais, capazes de marcar apenas uma CQ.

In this manner, it is possible to consider follicular and epidermal patterns of distribution for the CK. These specific patterns allow CK to be used as important markers for epithelial differentiation.

As mentioned above, CK 6 and CK 16 are expressed in the epidermis in situations where hyperproliferation occurs, such as in psoriasis and in epithelial tumors, for which it has also been denominated hyperproliferative CK. The experimental induction of CK 6 has already been demonstrated, when the epidermis is stimulated by cytokines, such as interferon gamma, epithelial growth factor (EGF) and tumor necrosis factor (TNF), as well as by ultraviolet radiation, and the latter also induces CK 19, thus illustrating the dynamic aspects of CK expression.^{10,11}

All the CK have a similar molecule, constituted by four helical segments - 1A, 1B, 2A and 2B - interspersed by short non-helical segments, called ligand segments L1, L12 and L2. In the extremity the variable segments V1 and V2 are found, while basic CK present segments H1 and H2 between the helical and variable segments^{4,9,12} (Figure 4). Despite such a close similarity, monoclonal antibodies have been developed that are capable of marking each CK.

Figura 3: Padrão folicular das citoqueratinas com a técnica imuno-histoquímica de Apaap;

a) as citoqueratinas basais (seta) são expressas na bainha radicular externa (seta larga); b) as citoqueratinas suprabasais (seta) não são expressas na bainha radicular externa (seta larga); o setor acima da glândula sebácea (asterisco) tem uma diferenciação epidérmica; c) a citoqueratina 19 é expressa na camada basal da bainha radicular externa

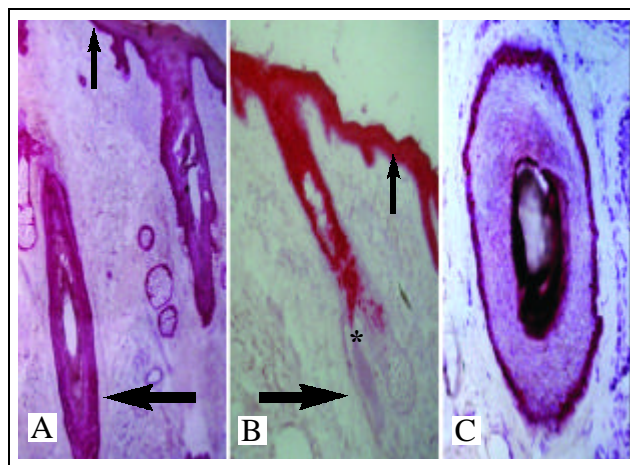


Figure 3: Follicular pattern of the cytokeratins using APAAP immunohistochemistry technique; a) the basal cytokeratins (arrow) are expressed in the outer root sheath (large arrow); b) the suprabasal cytokeratins (arrow) are not expressed in the outer root sheath (large arrow); the section above the sebaceous gland (asterisk) presents epidermal differentiation; c) cytokeratin 19 is expressed in the basal layer of the external root sheath

Figura 4: Representação esquemática das moléculas das citoqueratinas, com os segmentos helicoidais (1A, 1B, 2A, 2B), segmentos de ligação (L1, L12, L2), segmentos homólogos (H1, H2) - presentes somente nas citoqueratinas básicas - e os segmentos variáveis (V1 e V2). A localização mais frequente das mutações está demonstrada em diversas doenças (cirrose criptogênica - CC, epidermólise bolhosa simples - EBS, hiperqueratose epidermolítica - HQE, paquioníquia congênita - PC, distrofia corneana de Meesman - DCM)

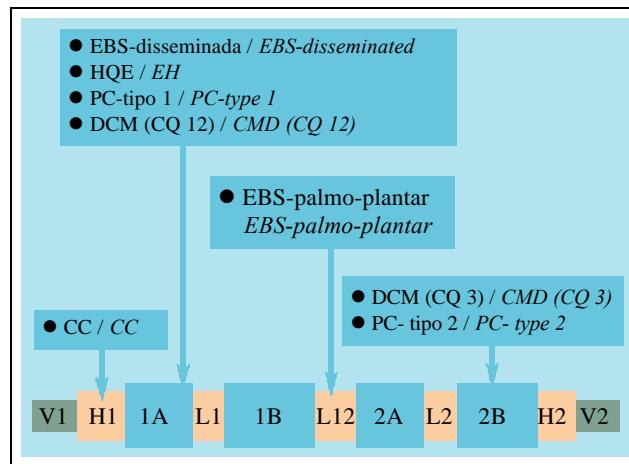


Figure 4: Schematic representation of the molecules of the cytokeratins, with the helical segments (1A, 1B, 2A and 2B), ligand segments (L1, L12 and L2), homologous segments (H1 and H2) - present only in the basic cytokeratins - and the variable segments (V1 and V2). The most frequent location of the mutations is demonstrated in various diseases (cryptogenic cirrhosis - CC, epidermolysis bullosa simplex - EBS, epidermolytic hyperkeratosis - EH, pachyonychia congenita - PC, corneal Meesman dystrophy - DCM)

A utilização desses anticorpos monoclonais permite, por exemplo, mostrar quais CQ são encontradas em determinado tumor, podendo-se fazer referência à origem dessas células com base em marcadores moleculares e não só em aspectos morfológicos.

UTILIZAÇÃO EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

A aplicação de anticorpos monoclonais marcadores de CQ permite investigar a origem de tumores e seu diagnóstico diferencial.

O carcinoma basocelular expressa as CQ basais 5 e 14, a CQ 17 e a CQ 19 (Figura 5), padrão semelhante ao do folículo piloso,^{13,14} tendo sido sugerida a possibilidade de ele se originar da bainha radicular externa,¹⁵ o que se correlaciona com achados clínicos, pois esse tumor não é encontrado nas regiões palmoplantares.

Da mesma forma a identificação da CQ 20 já é utilizada no diagnóstico do carcinoma das células de Merkel,¹⁶ bem como na identificação precoce de metástases nos linfonodos-sentinelas.¹⁷

Também na cirurgia micrográfica de Mohs, a marcação com anticorpos contra CQ permite que se aumente o sucesso desse tipo de tratamento cirúrgico,¹⁸ pois células de difícil visualização com a hematoxilina e eosina podem ser identificadas com os anticorpos.

Anticorpos de baixa especificidade, marcadores de diversas CQ, podem ser utilizados no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas; uma vez expressando esses marcadores epiteliais, pode-se afirmar tratar-se de carcinoma indiferenciado, diferenciando-se assim, por exemplo, de linfomas.

De maneira semelhante, anticorpos antivimentina são utilizados no diagnóstico de tumores mesenquimais, porém o grande número de citoqueratinas faz com que seu uso no diagnóstico das neoplasias epiteliais seja bem mais amplo do que no caso da vimentina.

MUTAÇÕES

Outra utilização importante desses novos conhecimentos é nas genodermatoses por mutação das CQ. Na

The use of these monoclonal antibodies allows, for instance, the determination of which CK are found in a given tumor and the origin of these cells, based on molecular markers and not just their morphologic aspects.

USE IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The application of monoclonal antibodies markers of CK enables an investigation into the origin of tumors and their differential diagnosis.

Basal cell carcinomas express basal CK 5 and 14, CK 17 and CK 19 (Figure 5), a pattern similar to that of the hair follicle,^{13,14} and the possibility has been suggested that they originate from the outer root sheath,¹⁵ which correlates with clinical findings, since this tumor is not found in palmar or plantar areas.

Likewise, the identification of CK 20 is already used in the diagnosis of Merkel cell carcinoma,¹⁶ as well as in the precocious identification of metastases in the sentinel lymph nodes.¹⁷

Also in Mohs' micrographic surgery, the demarcation with antibodies against CK enables an increase in the success rate for this type of surgical treatment,¹⁸ because cells that are difficult to visualize with hematoxylin and eosin can be identified with the antibodies.

Antibodies with low specificity that mark several CK, can be used in the diagnosis of undifferentiated neoplasias; since when expressing these epithelial markers, it can be affirmed that it is an undifferentiated carcinoma, thereby differentiating it from the lymphomas, for example.

In a similar way, antivimentin antibodies are used in the diagnosis of mesenchymal tumors, however the great number of cytokeratins means that their use in the diagnosis of the epithelial neoplasias is much more widespread than in the case of the vimentin.

MUTATIONS

Another important application for this new knowledge is in the genodermatoses due to mutation of CKs. In

Figura 5: Expressão das citoqueratinas no carcinoma basocelular; a) as citoqueratinas basais (seta) estão presentes no tumor (seta larga); b) as citoqueratinas suprabasais (seta) não são expressas pelo tumor (asterisco); c) a citoqueratina 19, como no folículo piloso, só é expressa por algumas células (setas); d) a citoqueratina 17 é expressa pela bainha radicular externa e pelas células tumorais (setas)

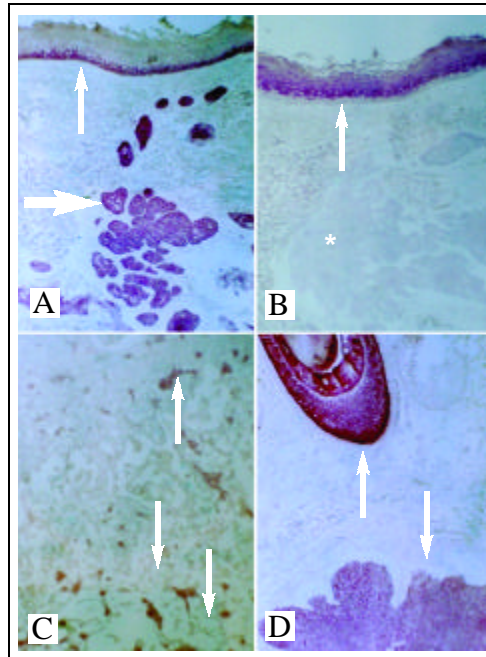


Figure 5: Expression of the cytokeratins in basal cell carcinoma; a) the basal cytokeratins (arrow) are present in the tumor (large arrow); b) the suprabasal cytokeratins (arrow) are not expressed by the tumor (asterisk); c) cytokeratin 19, as in the hair follicle, is only expressed by several cells (arrows); and d) cytokeratin 17 is expressed by the outer root sheath and by the tumor cells (arrows)

medida em que elas são expressas de forma localizada, a doença conseqüente dessa mutação será específica de determinadas células e de determinados segmentos epiteliais. Geralmente estão associadas à citólise, pois a célula desaba por alteração do citoesqueleto.

A alteração da camada basal por mutação, seja da CQ 5 seja da 14, leva à degeneração da camada basal (Figura 6), com fragilidade e formação de bolhas, características da epidermólise bolhosa simples (EBS)^{19,20} a primeira enfermidade na qual foi demonstrada mutação de uma CQ.^{21,22} Nas formas disseminadas da doença as mutações localizam-se nas extremidades do domínio helicoidal, ou seja, no início de 1A ou no final de 2B;²³ nas formas palmoplantares localizam-se na região L12²¹ (Figura 4).

Já foi demonstrado, *in vitro*, que mutação da CQ 14 impede a polimerização normal, tendo menor resistência e elasticidade do que o heteropolímero normal.³ Outra alteração apontou que queratinócitos de pacientes com EBS são mais sensíveis a choque osmótico *in vitro* e demoram mais para se recuperar do que células normais,²² demonstrando a diminuição de sua resistência, que culmina *in vivo* com as bolhas.

De forma semelhante à fragilidade e degeneração da camada basal, como as vistas na EBS, alterações das CQ suprabasais levam à degeneração nas camadas altas da epiderme, características da hiperqueratose epidermolítica (HQE) (Figura 6). Também nessa enfermidade foram descritas mutações em CQ, nesse caso da CQ 1 ou CQ 10, que são expressas nessas mesmas camadas da epiderme.²⁴⁻²⁶ Os pacientes com mutação da CQ 10 tendem a um quadro clínico mais severo, e aqueles com mutação da CQ 1 são acompanhados de hiperqueratose palmoplantar. Nos pacientes com defeito da CQ 10, talvez a CQ 9, presente no estrato lúcido, compense o defeito da CQ 10, já que são do mesmo grupo de CQ ácidas,²⁶ se bem que já foram descritas mutações da CQ 10 com acometimento palmoplantar.²⁷

As mutações da CQ 9, já que é encontrada na epiderme palmoplantar, acompanham-se de degeneração restrita a essa área, típica da queratodermia palmoplantar epidermolítica;²⁸⁻³⁰ também nessa doença as mutações foram

that as they are expressed in a localized form, disease consequent to this mutation will be specific to certain cells and certain epithelial segments. They are generally associated with cytolysis, since the cell collapses as a result of alterations in the cytoskeleton.

The alteration of the basal layer by mutation, whether CK 5 or 14, leads to the degeneration of the basal layer (Figure 6), with the fragility and formation of blisters, characteristic of epidermolysis bullosa simplex (EBS)^{19,20} the first illness in which the mutation of a CK.²¹ In the disseminated forms of the disease the mutations are located in the extremities of the helical domain, or in other words, at the beginning of 1A or at the end of 2B;²³ in the palmoplantar forms they are located in the region of L12²¹ (Figure 4).

It has already been demonstrated *in vitro* that the mutation of CK 14 impedes normal polymerization, besides presenting less resistance and elasticity than the normal heteropolymer.³ Another alteration has indicated that keratinocytes of patients with EBS are more sensitive to osmotic shock *in vitro* and take longer to recover than normal cells,²² thereby demonstrating the decrease in their resistance, that culminates *in vivo* in blisters.

In a similar manner to the fragility and degeneration of the basal layer, as seen in EBS, alterations of the suprabasal CK lead to a degeneration in the upper epidermis, characteristic of epidermolytic hyperkeratosis (EH) (Figure 6). Also in this illness mutations have been described in CK, namely CK 1 or CK 10, that are expressed in the same layers of the epidermis.²⁴⁻²⁶ Patients with a CK 10 mutation tend to present a more severe clinical picture, while a CK 1 mutation is accompanied by palmoplantar hyperkeratosis. In patients with a defect in CK 10, it is possible that CK 9, present in the stratum lucidum, compensates for the defect in CK 10, since they belong to the same group of acid CKs,²⁶ mutations of CK 10 have already been described with palmar and plantar involvement.²⁷

Mutations of CK 9, since it is found in the palmoplantar epidermis, are accompanied by a degeneration restricted to that area, typical of epidermolytic palmoplantar

Figura 6: Fragilidade e citólise das camadas suprabasais (seta) (a), levando ao quadro clínico da hiperqueratose epidermolítica (c), na qual a fragilidade é mostrada pela perda da hiperqueratose (seta) (b), levando ao quadro clínico da epidermólise bolhosa simples (d)

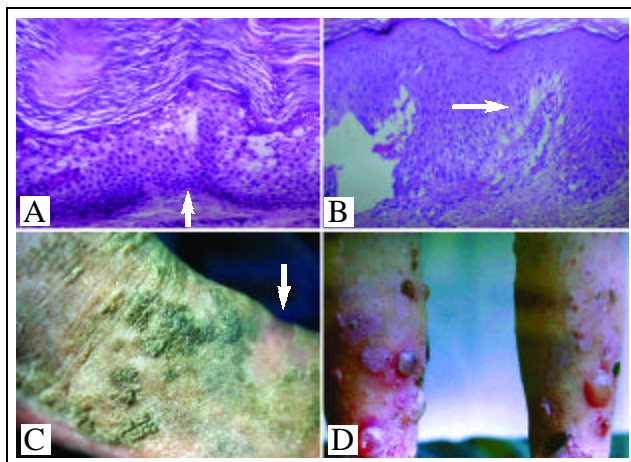


Figure 6: Fragility and cytolysis of the suprabasal layers (a), leading to the clinical picture of the epidermolytic hyperkeratosis (c), in the which the fragility is shown by the loss of the hyperkeratosis (arrow). Fragility and cytolysis of the basal layers (b), leading to a clinical picture of epidermolysis bullosa simplex (d)

encontradas no início do segmento 1A.³⁰

Seguindo esse mesmo princípio entre a localização específica da expressão normal de uma CQ e aquela da enfermidade decorrente de suas mutações, pôde-se também esclarecer a variabilidade clínica da paquioníquia congênita. Na do tipo 1, caracterizada pela alteração ungueal mais hiperqueratose palmoplantar e leucoderma oral, foram detectadas mutações das CQ 6a e 16, encontradas nessas regiões.^{31,32} Na do tipo 2, além do engrossamento da lâmina ungueal, ocorrem cistos na puberdade, sendo muitas vezes difícil diferenciar os subtipos na infância.³¹ Nessa variante foram descritas mutações na CQ 17^{33,34} e posteriormente em uma família na CQ 6b.

No esteatocistoma múltiplo, cujos cistos são semelhantes aos da paquioníquia congênita tipo 2, também foram descritas mutações na CQ 17 - incluindo mutações idênticas, que podem ser consideradas variantes clínicas, pois em alguns casos há também acometimento ungueal leve³¹ -, outros fatores genéticos devem estar envolvidos, explicando os fenótipos diferentes de mutações iguais,³¹ sem que ainda se consiga explicá-los.

Nos últimos anos pôde-se esclarecer a genética molecular de algumas distrofias corneanas com mutações das CQ presentes nesse epitélio. Na distrofia corneana de Meesman, foram descritas mutações na CQ 3 e 12. Clinicamente são vistas opacidade e vesículas intraepiteliais, e qualquer das duas CQ podem estar envolvidas, levando ao mesmo quadro clínico oftalmológico, de forma muito semelhante ao que ocorre na EBS.³⁵⁻³⁷

Nos epitélios simples, encontrados no fígado, pâncreas e intestino, verificam-se também enfermidades associadas a mutações, envolvendo o citoesqueleto, descritas recentemente. Na cirrose criptogênica, a qual ocorre sem hepatite viral, alcoolismo ou outra causa conhecida, foram descritas mutações nas CQ 8 e 18 em alguns desses pacientes.³⁸⁻³⁹

Novas informações nessa área têm ampliado as correlações entre fenótipo e genótipo, e permitido melhor compreensão da patogenia e variabilidade clínica de muitas dermatoses;^{40,41} o conhecimento dessas mutações pode ser utilizado também no diagnóstico pré-natal a partir de DNA obti-

tar keratoderma;²⁸⁻³⁰ likewise, in this disease the mutations have been found at the beginning of segment 1 A.³⁰

According to the same principle between the specific location of the normal expression of a CK and that of the illness due to its mutations, one can also explain the clinical variability of congenital pachyonychia. In type 1, characterized by ungueal alteration plus palmoplantar hyperkeratosis and oral leukoderma, mutations have been detected in the CK 6a and 16 found in these regions.^{31,32} In type 2, besides the thickening of the ungueal blade, cysts can occur at puberty, that are often difficult to differentiate from the subtypes in infancy.³¹ In this variant, mutations have been described in CK 17^{33,34} and later in a family case in CK 6b.

In steatocystoma multiplex, whose cysts are similar to those of type 2 pachyonychia congenita, mutations have also been described in CK 17 - including identical mutations, that can be considered clinical variants, since in some cases there is also mild ungueal involvement,³¹ other genetic factors must be involved, as this would explaining the different phenotypes resulting from the same mutations,³¹ however; these have yet to be clarified.

In recent years, it has been possible to explain the molecular genetics of some corneal dystrophies with mutations of CK present in that epithelium. In corneal Meesman dystrophy, mutations have been described in CK 3 and 12. Clinically opacity and vesicles intraepithelial are seen, and any of two CK can be involved, leading to the same ophthalmologic clinical picture, in a way very similar to that which occurs in EBS.³⁵⁻³⁷

In the simple epithelium, found in the liver, pancreas and intestine, illnesses have also been verified associated to mutations, involving the cytoskeletons, described recently. In some patients with cryptogenic cirrhosis, which occurs without viral hepatitis, alcoholism or any other known cause, mutations have been described in CK 8 and 18.³⁸⁻³⁹

New information in this area has contributed to further correlations between phenotype and genotype, and has allowed a better understanding of the pathogenesis and clinical variability of many dermatoses;^{40,41} Knowledge of these mutations can also be used in the prenatal diagnosis

do por biópsia de córion,^{42,43} podendo ser feito ao redor da décima semana de gestação, substituindo a biópsia de pele por fetoscopia feita entre a décima oitava e a vigésima semana. As complicações nesse caso ocorrem entre 4 e 7% dos casos, sendo que na biópsia coriônica apenas em 1%.

As informações obtidas nas últimas duas décadas sobre as CQ trouxeram inúmeros avanços na compreensão de diversas enfermidades cutâneas, demonstrando a importância da pesquisa laboratorial e sua posterior aplicação no cotidiano médico. □

REFERÊNCIAS / REFERENCES

- Langbein L, Rogers MA, Winter H *et al.* The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem* 1999; 274: 19.874-84.
- Alberts B, Bray D, Johnson A *et al.* O Citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fundamentos da Biologia Celular- Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed 1999; 526-60.
- Ma L, Xu J, Coulombe PA, Wirtz D. Keratin filament suspension show unique micromechanical properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 19.145- 51.
- Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-22.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Schweizer J. The catalog of human hair keratins II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem* 2001; 276: 35123-32.
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Winter H, Schweizer J. K6irs1, K6irs2, K6irs3 and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 512-22.
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Aoki N, Winter H, Schweizer J. A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized Huxley cells (Flügelzellen) of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 2001; 118: 789-99.
- Smith FJD. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 347-364.
- Berner F, Del Bino S, Asselineau. Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet A exposure. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1421-9.
- Hattori N, Komine M, Yano *et al.* Interferon- γ , a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 403-10.
- Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Lizuka H. Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. *Histol Histopathol* 2002; 17: 331-8.
- Schirren CG, Rutten A, Kaudewitz P, Diaz C, McClain S, Burgdorf WH. Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am J Dermatopathol* 1997; 19: 341-50.
- Kurzen H, Esposito L, Langbein L, Hartschuh W. Cytokeratins

based on DNA obtained by chorionic biopsy,^{42,43} which can be performed around week 10 of gestation, thereby substituting skin biopsy by fetoscopy done between the week 18 and 20. Complications in the latter occur between 4 and 7% of the cases, as opposed to just 1% in chorionic biopsy.

The information obtained in the last two decades on CK has brought countless advances in the understanding of various cutaneous diseases, thereby demonstrating the importance of laboratorial research and its subsequent application in daily practice. □

as markers of are neoplasms with follicular differentiation: an immunohistochemical study of trichoblastoma and basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 501-9.

- Asada M, Schaart FM, Almeida Jr. HL, Korge B, Kurokawa I, Asada Y, Orfanos CE. Solid basal cell epithelioma (BCE) possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1993; 93:286-292.
- Leech SN, Kolar AJ, Barret PD, Sinclair SA, Leonard N. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *J Clin Pathol* 2001; 54: 727-9.
- Su LD, Lowe L, Bradford CR, Yahanda AI, Johnson TM, Sondak VK. Immunostaining for cytokeratin 20 improves detection of micrometastatic Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 661-6.
- Smeets NW, Stavast-Kooy AJ, Krekels GA, Daemen MJ, Neumann HA. Adjuvant cytokeratin staining in Mohs micrographic surgery for basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2003; 29: 375-7.
- Sasaki Y, Shimizu H, Akiyama M *et al.* A recurrent keratin 14 mutation in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex. *Br J Dermatol* 1999; 141: 747-8.
- Liovic M, Stojan J, Bowden PE *et al.* A novel keratin 5 mutation (K5V186L) in a family with EBS-K: a conservative substitution can lead to development of different disease phenotypes. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 964-9.
- Yasukawa K, Sawamura D, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu H. Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly. *J Biol Chem* 2002; 277: 23670-4.
- D'Alessandro M, Russell D, Morley SM, Davies AM, Lane EB. Keratin mutations of epidermolysis bullosa simplex alter the kinetics of stress response to osmotic shock. *J Cell Sci* 2002; 115: 4341-51.
- Premaratne C, Klingberg S, Glass I, Wright K, Murrell D. Epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara due to an arginine to cysteine substitution in exon 1 of keratin 14. *Aust J Dermatol* 2002; 43: 28-34.
- Arin MJ, Longley MA, Anton-Lamprecht I *et al.* A Novel Substitution in Keratin 10 in Epidermolytic Hyperkeratosis. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 506-8
- Arin MJ, Longley MA, Küster W *et al.* An asparagine to threonine substitution in the 1A domain of Keratin 1: a novel mutation that causes epidermolytic hyperkeratosis. *Exp Dermatol* 1999; 8: 124-7.
- Virtanen M, Gedde-Dahl Jr. T, Mörk NJ, Leigh I, Bowden PE, Vahlquist A. Phenotypic/ Genotypic correlations in patients with epidermolytic hyperkeratosis and the effects of retinoid therapy on keratin expression. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 163-70.

27. Sun XK, Ma LL, Xie YQ, Zhu XJ. Keratin 1 and 10 mutations causing epidermolytic hyperkeratosis in Chinese patients. *J Dermatol Sci* 2002; 29: 195-200.
28. Covello SP, Irvine AD, McKenna KE *et al.* Mutations in Keratin K9 in Kindreds with Epidermolytic Palmoplantar Keratoderma and Epidemiology in Northern Ireland. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1207-9.
29. Asadi AK, Kotcher LB, Jih MH. The molecular basis of hereditary palmoplantar keratodermas. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:327-43.
30. Rugg EL, Common JEA, Wilgos A *et al.* Diagnosis and confirmation of epidermolytic palmoplantar keratoderma by the identification of mutations in keratin 9 using denaturing high-performance liquid chromatography. *Br J Dermatol* 2002; 146: 952-7.
31. Smith FJD, Coleman CM, Bayoumy NM *et al.* Novel Keratin 17 Mutations in Pachyonychia Congenita Type 2. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 806-8.
32. Connors JB, Rahil AK, Smith FJD, McLean WHI, Milstone LM. Delayed-onset pachyonychia congenita associated with a novel mutation in the central 2B domain of keratin 16. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1058-62.
33. Feng YG, Xiao SX, Ren XR, Wang WQ, Liu A, Pan M. Keratin 17 mutation in pachyonychia congenita type 2 with early onset sebaceous cysts. *Br J Dermatol* 2003; 148: 452-5.
34. Hashiguchi T, Yotsumoto S, Shimada H *et al.* A novel mutation in the keratin 17 gene in a Japanese case of pachyonychia congenita type 2. *J Invest Dermatol* 2002; 118:545-7.
35. Gupta SK, Hodge WG. A new clinical perspective of corneal dystrophies through molecular genetics. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; 10: 234-41.
36. Corden LD, Swenson O, Swenson B *et al.* Molecular genetics of Meesmann's corneal dystrophy: ancestral and novel mutations in keratin 12 (K12) and complete sequence of the human KRT12 gene. *Exp Eye Res* 2000; 70: 41-9.
37. Swenson O, Swenson B, Nolle B, Rochels R, Wannke B, Thiel HJ. Mutations in the keratin gene as a cause of Meesmann-Wilke corneal dystrophy and autosomal dominant skin cornification disorders. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2000; 217: 43-51.
38. Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* 1997; 99:19-23.
39. Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med* 2001; 344:1580-7.
40. Almeida Jr. HL. Genética Molecular das Epidermólises Bolhosas. *An Bras Dermatol* 2002; 77: 519-32.
41. Uitto J, Pulkkinen L. Molecular genetics of heritable blistering disorders. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1458-61.
42. Rugg EL, Baty D, Shemanko CS *et al.* DNA based prenatal testing for the skin blistering disorder epidermolysis bullosa simplex. *Prenat Diagn* 2000;20:371-7.
43. Pulkkinen L, Uitto J. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 1999;18:29-42.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

Prof. Dr. Hiram Larangeira de Almeida Jr.

Universidade Católica de Pelotas

Mestrado em Saúde e Comportamento

Rua Almirante Barroso, 1202 - 107 - Bloco G

96010-280 Pelotas RS

E-mail: biramalmeidajr@hotmail.com

1. No citoesqueleto das células epiteliais **não** encontramos:
 - a. Queratinas duras.
 - b. Microtúbulos.
 - c. Citoqueratinas.
 - d. Filamentos de actina.
2. **Não** é função do citoesqueleto:
 - a. Participar da motilidade celular.
 - b. Auxiliar no transporte de organelas.
 - c. Produzir a haste do cabelo.
 - d. Dar a estrutura tridimensional da célula.
3. Qual das proteínas abaixo **não** é um filamento intermediário?
 - a. Vimentina.
 - b. Laminina.
 - c. Desmina.
 - d. Neurofilamentos.
4. Assinale a alternativa **incorreta**:
 - a. As citoqueratinas são constituídas por quatro segmentos helicoidais (1A, 1B, 2A, 2B).
 - b. A homologia molecular entre as diversas citoqueratinas impede o desenvolvimento de anticorpos monoclonais.
 - c. Os segmentos helicoidais são intercalados por segmentos de ligação (L1, L12 e L2).
 - d. As citoqueratinas básicas têm também os segmentos H1 e H2.
5. Qual afirmação abaixo é **incorreta**?
 - a. As citoqueratinas têm distribuição tecidual específica.
 - b. As citoqueratinas formam em muitos epitélios heterodímeros.
 - c. As citoqueratinas ancoram-se nos desmossomas e hemidesmossomas.
 - d. O padrão de citoqueratinas de um epitélio não sofre variações.
6. Assinale a afirmativa **incorreta**:
 - a. As citoqueratinas são divididas em ácidas e básicas.
 - b. Na bainha radicular interna encontram-se variantes da CQ 6.
 - c. As citoqueratinas não são capazes de se autopolimerizar.
 - d. As tricoqueratinas são divididas em ácidas e básicas.
7. Assinale a afirmativa **incorreta**:
 - a. A epiderme expressa citoqueratinas diferentes na camada basal e nas camadas suprabasais.
 - b. O folículo piloso expressa as citoqueratinas basais.
 - c. Na psoríase não ocorre mudança nas citoqueratinas epidérmicas.
 - d. O setor folicular acima da glândula sebácea tem um padrão epidérmico de citoqueratinas.
8. Com relação ao carcinoma basocelular, assinale a afirmativa correta:
 - a. São encontradas as citoqueratinas basais e suprabasais.
 - b. São encontradas as citoqueratinas suprabasais.
 - c. O padrão encontrado é o da bainha radicular interna.
 - d. O padrão encontrado é o da bainha radicular externa.
9. Em qual das situações abaixo a demarcação imuno-histoquímica das citoqueratinas é **negativa**?
 - a. Nos carcinomas indiferenciados.
 - b. No carcinoma de Merkel.
 - c. No carcinoma basocelular.
 - d. No dermatofibrossarcoma protuberante.
10. Em qual das formas abaixo de epidermólise bolhosa foram descritas mutações em citoqueratinas?
 - a. Epidermólise bolhosa simples
 - b. Epidermólise bolhosa juncional
 - c. Epidermólise bolhosa distrófica
 - d. Epidermólise bolhosa adquirida
11. Assinale a afirmativa **incorreta**.
 - a. Na psoríase encontram-se na epiderme as chamadas citoqueratinas hiperproliferativas.
 - b. A célula de Merkel expressa a CQ 20.
 - c. A CQ 19 é encontrada em todas as células tumorais do carcinoma basocelular.
 - d. A bainha radicular externa expressa as chamadas citoqueratinas hiperproliferativas.
12. Em quais citoqueratinas ainda **não** foi descrita mutação?
 - a. CQ 1 e 10.
 - b. CQ 5 e 14.
 - c. CQ 3 e 12.
 - d. CQ 19 e 20.
13. A alteração celular mais vista nas doenças por mutação das citoqueratinas é:
 - a. Cariorrexe.
 - b. Citólise.
 - c. Espongiose.
 - d. Acantólise.

Questões e Resultados das Questões / *Questions and Answers to Questions*

14. Em que parte do gen das citoqueratinas basais localiza-se a maioria das mutações da epidermólise bolhosa simples palmoplantar?

- a. No início do segmento 1A.
- b. No final do segmento 2B.
- c. No segmento não-helicoidal L12.
- d. No início do segmento 2B.

15. Em qual doença existe variabilidade clínica, dependendo da CQ mutada?

- a. Epidermólise bolhosa simples
- b. Cirrose criptogênica
- c. Paquioníquia congênita
- d. Distrofia corneana

16. Na cirrose criptogênica foram descritas mutações nas CQ:

- a. CQ 8 e 18.
- b. CQ 6 e 16.
- c. CQ 1 e 11.
- d. CQ 9 e 19.

17. Na paquioníquia congênita foram descritas mutações nas CQ:

- a. CQ 6.
- b. CQ 16.
- c. CQ 17.
- d. Todas as anteriores.

18. Na hiperqueratose epidermolítica foram descritas mutações nas CQ:

- a. CQ 8 e 18.
- b. CQ 6 e 16.
- c. CQ 1 e 10.
- d. CQ 5 e 14.

19. Assinale a alternativa **incorreta**:

- a. As informações sobre mutações podem ser utilizadas no diagnóstico pré-natal a partir de biópsia coriônica.
- b. A alteração histológica da distrofia corneana de Meesmann é semelhante à da epidermólise bolhosa simples.
- c. Na queratoderma palmoplantar epidermolítica foram descritas mutações na CQ 9.
- d. Até o momento não é possível fazer correlações genofenotípicas.

20. Na distrofia corneana de Meesmann foram descritas mutações nas CQ:

- a. CQ 8 e 18.
- b. CQ 3 e 12.
- c. CQ 1 e 10.
- d. CQ 5 e 14.

GABARITO

Malformações Vasculares
2004; 79(1): 07-25

1. b	9. c
2. c	10. a
3. d	11. a
4. c	12. d
5. a	13. c
6. d	14. b
7. b	15. d
8. b	