

KARINA SOARES CUNHA

**INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA EM INDIVÍDUOS
COM MOSAICO PIGMENTAR DO TIPO ITO**

Campinas

2010

KARINA SOARES CUNHA

**INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA EM INDIVÍDUOS
COM MOSAICO PIGMENTAR DO TIPO ITO**

Dissertação de Mestrado, apresentada à
Comissão de Pós-graduação em Ciências
Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção de título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração Ciências
Biomédicas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

***Campinas
Unicamp***

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C914e Cunha, Karina Soares
Estudos citogenéticos em indivíduos com mosaico pigmentar do tipo Ito / Karina Soares Cunha. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Carlos Eduardo Steiner
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citogenética. 2. Técnicas de cultura de células. 3. Mosaicismo. 4. Transtorno da pigmentação. 5. Hipopigmentação.
I. Steiner, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Cytogenetic analysis in individuals with mosaic pigmentary of ito type

Keywords: • Cytogenetic
• Cell culture techniques
• Mosaicism
• Pygmentation disorders
• Hypopigmentation

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
Prof. Dr. Renata Ferreira Magalhães
Prof. Dr. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

Data da defesa: 26-08-2010

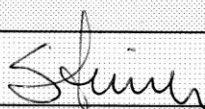
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Karina Soares Cunha

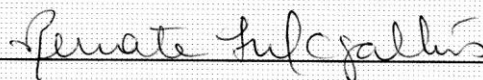
Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Membros:

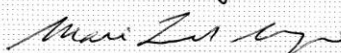
1. Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner -



2. Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães -



3. Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/2010

A todos que fizeram parte da minha vida durante esse período e compartilharam comigo a insegurança e as conquistas; pelo incentivo e apoio para que fosse possível a concretização deste trabalho e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos durante esse período.

Agradecimentos

Considerando que o mestrado é um resultado de uma longa caminhada, para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço a Deus, por colocar no meu caminho pessoas maravilhosas, que contrubuíram na minha formação pessoal e profissional, e por colocar as oportunidades no momento certo em meu caminho.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso. Pelo amor, amizade e apoio depositados, além da companhia por todos esses anos e por aceitar a minha ausência quando necessário:

Agradeço pela estrutura familiar, aos meus pais, Vandir e Elza, às minhas irmãs Keli, Katia e Keila, e aos sobrinhos, João Pedro, Ana Carolina e Victor Hugo, que torceram por mim e fazem da minha vida mais completa.

Ao meu namorado Tadeu, por aprender a entender a importância desse projeto, acreditar em mim e compreender os maus momentos. Pela paciência e viagens até Campinas “só” para trocar meio de cultura.

A todos os familiares, tios, tias e primos, que mesmo de longe sempre estiveram torcendo.

Agradeço particularmente a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Ao meu orientador Carlos Steiner, pela confiança, paciência e credibilidade, além das horas dispensadas em ler junto comigo projetos, relatórios, dissertação... obrigada.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Beatriz Puzzi. Mesmo não constando seu nome oficialmente como co-orientadora, sem sua participação a realização desse trabalho não seria possível. Obrigada por fornecer toda estrutura para realização de grande parte do projeto, pela simpatia e essencial contribuição.

À Dra. Carla Rosemberg, por fornecer subsídios para realização do array.

Às secretárias do Departamento de Genética Médica, pela colaboração na revisão dos prontuários e à secretária da pós-graduação, Marcinha, por facilitar a nossa vida em muitos momentos.

A todos os professores do Departamento de Genética, que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos funcionários, alunos e amigos dos laboratórios de Genética molecular, Citogenética e Laboratório de cultivo de células da pele, pela amizade e por me auxiliarem no desenvolvimento do projeto: Luciana, Romênia, Renato, Daniela, Marcelo, Bibiana, Daniel, Tathi, Marilza, Madá, Henry, Jô, Nilma, Jussara, Carú.

Às amigas, Milena, Ilária, Fabiana e Maiara, por terem sentido junto comigo, todas as angústias e felicidades, acompanhando cada passo de perto e contribuindo diariamente no laboratório.

À amiga Sú, por compartilhar comigo muitas histórias e ser a melhor companhia por fazer de cada passeio muito mais divertido (e sociável)! Agradeço também pela ajuda com o array...

À Carol, minha amiga, e companheira de apartamento, com quem compartilhei jantares, emails, dúvidas, aprendizado, lágrimas, histórias e muitas risadas. Além da nossa casa, claro!

Ao amigo Tarsis, pelo apoio e contribuições desde meu início na Unicamp até a conclusão da dissertação. Pelas diversas conversas, idéias, discussões e opiniões, que muito me ajudaram neste trabalho, pela torcida e otimismo, muito obrigada. E principalmente pelo convívio, pelas risadas, jantares, viagens, enfim, pela amizade.

É difícil separar a vida acadêmica da vida pessoal, já que na Unicamp encontrei pessoas que fizeram da vida acadêmica muito mais produtiva e divertida, seja pela amizade ou pela ajuda no dia-a-dia no laboratório. Melhor convívio não poderia encontrar.

Obrigada!

*“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”*

(Ricardo Reis)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xxv
LISTA DE TABELAS	xxvi
RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxxiii
1. INTRODUÇÃO	xxxvii
1.1. Mosaicismo pigmentar do tipo Ito	39
1.2. Mosaicismo	40
<i>1.2.1.- Mosaicismo cromossômico</i>	42
<i>1.2.2. Quimera</i>	42
<i>1.2.3. Disrupção gênica ou de elementos regulatórios no ponto de quebra do cromossomo</i>	42
<i>1.2.4. Mutação somática pré ou pós zigótica</i>	42
<i>1.2.5. Imprinting genético</i>	44
<i>1.2.6. Mosaicismo funcional resultante do processo de lyonização ou efeito epigenéticos</i>	44
1.3. Mosaicismo pigmentar	46
1.4. Linhas de Blaschko	48
1.5. Embriogênese e células da ectoderme: melanócitos e queratinócitos	50
1.6. Aspectos clínicos do MP tipo Ito	51
<i>1.6.1. Alterações neurológicas</i>	54
<i>1.6.2. Sistema músculo esquelético</i>	55
<i>1.6.3. Alterações oftalmológicas</i>	55
<i>1.6.4. Outros</i>	32
<i>1.6.5. Achados histológicos</i>	56
1.7. Alterações cromossômicas	56
1.8. Dados epidemiológicos	63
1.9. Fatores genéticos: Herança e recorrência	64
1.10. Diagnósticos diferenciais	66

1.10.1. <i>Hipermelanose com manchas difusas e lineares (LWH)</i>	66
1.10.2. <i>Nevus depigmentoso</i>	66
1.10.3. <i>Nevus depigmentoso generalizado</i>	66
1.10.4. <i>Incontinência pigmentar tipo Bloch-Sulzberger (IP)</i>	67
1.10.5. <i>Esclerose tuberosa</i>	67
1.10.6. <i>Nevo Epidérmico e síndrome do Nevo epidérmico</i>	68
1.10.7. <i>Hipomelanose filóide</i>	68
1.10.8. <i>Cutis tricolor</i>	68
1.11. Prognóstico	68
2. JUSTIFICATIVA	69
3. OBJETIVOS	73
3.1. Objetivo Geral	75
3.2. Objetivos específicos	75
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	77
4.1. Cultura e padronização da preparação cromossômica a partir de células epiteliais	79
4.1.1. <i>Amostra inicial</i>	79
4.1.2. <i>Cultivo de células da pele</i>	79
4.1.3. <i>Padronização da técnica citogenética</i>	81
4.1.4. <i>Queratinócitos</i>	82
4.1.5. <i>Melanócitos</i>	83
4.2. Cultura e preparação cromossômica a partir de fibroblastos	84
4.3. Cariótipo de linfócitos	85
4.4. Seleção e amostra dos pacientes	86
4.5. Estudos complementares	86
4.5.1. <i>Teste de inativação do cromossomo X por replicação tardia</i>	87
4.5.2. <i>Hibridização in situ por fluorescência (FISH)</i>	87
4.5.3. <i>Array-CGH</i>	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89

5.1. Cultura e padronização da preparação cromossômica a partir de células epiteliais	91
5.1.1. <i>Queratinócitos</i>	92
5.1.2. <i>Melanócitos</i>	94
5.2. Cariótipo de fibroblastos e linfócitos	96
5.3. Casos com alterações cromossômicas	99
5.3.1 <i>Caso 2</i>	99
5.3.2. <i>Caso 7</i>	109
5.3.4. <i>Caso 12</i>	117
5.3.4. <i>Caso 14</i>	120
6. CONCLUSÕES	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8. ANEXOS	145
Anexo 1. Parecer do comitê de ética em pesquisa/FCM/Unicamp	147
Anexo 2. Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	149
Anexo 3. Dados clínicos dos indivíduos incluídos no estudo	151

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Array</i> -CGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i> (hibridização genômica comparativa baseada em plataforma array)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
cnv	<i>Copy number variation</i>
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
DGM	Departamento de Genética médica
D	Direito
del	Deleção
der	Cromossomo derivado
DM	Deficiência mental
dup	Duplicação
E	Esquerdo
FCM	Faculdade de ciências médicas
FISH	Hibridização in situ fluorescente
HA	Hemiabdomen
HI	Hipomelanose de Ito
HT	Hemitórax
IB/USP	Instituto de Biosciências da Universidade Estadual de São Paulo
IP	Incontinência pigmentar
inv	Inversão
Kb	Kilobase
LWH	Hiperpigmentação linear e difusa
MM	Membros
MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores

MP	Mosaico pigmentar
NOR	Região organizadora de nucléolo
PCA	persistência do canal arterial
PD	Preparação direta
r	Cromossomo em anel (do inglês, <i>ring</i>)
RDNPM	Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
RM	Retardo mental
RMLX	Retardo mental ligado a X
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
t(X;A)	Translocação X/autossomo
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
Xp	Braço p do cromossomo X
Xq	Braço q do cromossomo X
5-BrdU	5'bromodeoxiuridina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Padrão visual do Mosaico pigmentar do tipo Ito nas costas	39
Figura 2	Padrão de inativação do cromossomo X em mulheres com cariótipo normal e portadoras de translocação X/autossomo	45
Figura 3	Padrões de pigmentação associados a Mosaico Pigmentar	47
Figura 4	Esquema representativo das linhas de Blaschko	49
Figura 5	Representação da pele humana com destaque para a epiderme	51
Figura 6	Fotos de pacientes com Mosaico Pigmentar tipo Ito	52
Figura 7	Aspecto das lesões cutâneas em pacientes com Incontinência pigmentar nos estágios 2 e 3	67
Figura 8	Cultura inicial mista, com presença de melanócitos, queratinócitos e fibroblastos	91
Figura 9	Culturas homogêneas fotografadas em microscópio de inversão	91
Figura 10	Imagem de metáfase e cariótipo obtido a partir de queratinócitos em cultura teste	92
Figura 11	Metáfases obtidas a partir de cultura de melanócitos por preparação direta	95
Figura 12	Metáfases obtidas a partir de cultura de melanócitos por preparação direta com adição de 5-BrdU	96
Figura 13	Foto da região lombar do caso 2	99
Figura 14	Cariótipo de linfócitos por bandamento G do caso 2	100
Figura 15	Cariótipo obtido a partir de fibroblastos da região da pele hipopigmentada do caso 2	100
Figura 16	Metáfase obtida através de FISH com sonda DXZ1	101
Figura 17	Metáfase de linfócitos por teste de replicação tardia do indivíduo 2	103
Figura 18	Esquema representativo das hipóteses de inativação de X do caso 2	105
Figura 19	CNV encontrado no cromossomo 15 do caso 2	107

Figura 20	<i>Chromosome view</i> mostrando o cromossomo 21 do caso 2	108
Figura 21	<i>Chromosome view</i> mostrando o cromossomo X do caso 2 e nenhuma alteração	108
Figura 22	Cariótipo por bandamento G do caso 7	110
Figura 23	Esquema representativo do cromossomo 22 e da sonda MD Di George/VCF	112
Figura 24	FISH metafásico do caso 7	113
Figura 25	FISH interfásico do caso 7	115
Figura 26	Cariótipo de linfócitos do caso 12, banda G, C e NOR	118
Figura 27	Cariótipo de linfócitos por bandamento G do indivíduo do caso 14	121
Figura 28	FISH interfásico em células da mucosa oral do caso 12	123

TABELAS

Tabela I	Aberrações cromossômicas associadas a Mosaico Pigmentar do tipo Ito. Revisão da literatura	57
Tabela II	Resumo dos dados clínicos dos indivíduos incluídos no estudo	78
Tabela III	Cariótipo de linfócitos e fibroblastos dos indivíduos incluídos no estudo	97
Tabela IV	Resumo das características clínicas dos indivíduos estudados e das alterações citogenéticas encontradas.	98
Tabela V	Resultados de cariótipo e FISH obtidos do caso 7	116

RESUMO

O Mosaico pigmentar tipo Ito é uma alteração cutânea frequente, caracterizada por hipopigmentação da pele que, na maioria dos casos, segue o padrão linhas de Blaschko, geralmente associada a anomalias extracutâneas, sobretudo anomalias do Sistema Nervoso Central (SNC). Sugere-se que esse padrão decorre da presença e migração de duas linhagens celulares no período embrionário, com diferente expressão de genes associados à pigmentação, que darão origem à epiderme e ao SNC no feto. Diversos tipos de mosaicismo foram associados ao quadro e acredita-se que os casos em que não houve tal detecção se devam à limitação das células analisadas. Devido à função, origem embrionária e migração celular, possivelmente o mosaicismo seria melhor identificado em melanócitos e queratinócitos, principalmente na presença de alterações no SNC, as alterações poderiam ter envolvimento com o prognóstico neurológico. Neste estudo foi realizada análise citogenética de linfócitos e fibroblastos de 15 indivíduos com mosaico pigmentar do tipo Ito. Os objetivos incluíram padronizar a cultura de células de melanócitos e queratinócitos, visando analisar o cariótipo desses indivíduos nesses tipos celulares. O estudo citogenético nesses tipos celulares, porém, não pode ser realizado devido à dificuldade de se obter metáfases adequadas para análise. Assim, foi desenvolvido protocolo de cultura e análise citogenética em queratinócitos, o qual funcionou adequadamente em indivíduos testes, porém sem resultado semelhante nos sujeitos de pesquisa. A preparação cromossômica a partir de melanócitos, por outro lado, não se mostrou adequada. Na análise de linfócitos e fibroblastos, foram encontradas alterações cromossômicas diferentes em quatro indivíduos (26% da casuística), presentes em ambos os tipos celulares. Não foram observadas divergências nas amostras a partir de pele hipo e normopigmentadas. Essas alterações incluíram um caso de t(X;21) regular, para o qual foram realizados estudos complementares de forma a aprimorar a investigação laboratorial, sendo análise por *array*-CGH, FISH e estudo de inativação de X. Um caso se tratou de trissomia 18 em mosaico, nesse indivíduo não foi possível a coleta de biópsia, porém foi realizado FISH interfásico em células da mucosa oral. Houve também um caso de r(22) em mosaico, o único que apresentou diferença na proporção de células alteradas em fibroblastos e linfócitos, possivelmente por maior instabilidade *in vitro* de cromossomos em anel em culturas de longa duração. O último caso alterado se refere a um cromossomo marcador, também em mosaico. Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura prévia. Assim, apenas um caso apresentou alteração cromossômica não em mosaico, representada por uma translocação X/autossomo regular, para a qual as técnicas de estudo utilizadas não detectaram justificativa para o padrão de mosaicismo observado clinicamente.

ABSTRACT

Pigmentary mosaicism of Ito type is a skin abnormality often characterized by hypopigmentation of the skin following, in most cases, the Blaschko lines, usually associated with extracutaneous abnormalities, especially abnormalities of the central nervous system (CNS). It is suggested that this pattern arises from the presence and migration of two cell lineages in the embryonic period, with different expression of genes associated with pigmentation, which will give rise to the epidermis and the CNS in the fetus. Several types of mosaicism have been associated with this disorder. In cases in which no mosaicism was detected, it is believed that this may be secondary to the limitation of the cells analyzed. Due to the function and embryonic cell migration, in individuals with pigmentary mosaicism, a cytogenetic mosaicism possibly would be better identified in melanocytes and keratinocytes, especially in the presence of changes in the CNS. Besides, these changes could prognose the neurological outcome. This study comprehended cytogenetic analysis of lymphocytes and fibroblasts from 15 individuals with pigmentary mosaicism of Ito type. The targets included standardize the cell culture of melanocytes and keratinocytes in order to analyze the karyotype of these individuals in these cell types. The cytogenetic study in these cell types, however, was not possible due to difficulties in obtaining adequate metaphases for analysis. Given this difficulty, another cell type (fibroblasts) was studied. In the end, chromosomal abnormalities in lymphocytes and fibroblasts were identified in four individuals. These included one case of a balanced translocation X/21, one case of trisomy 18 mosaicism, one case of a ring 22 mosaic and one marker chromosome, also in mosaic. Considering the results of cytogenetic lymphocytes and fibroblasts, additional studies were undertaken to enhance the laboratory investigation of these cases, including array-CGH, FISH and study of X inactivation. The results were compared with previous literature data. In conclusion, we developed protocol for culture and cytogenetic analysis in keratinocytes, which worked well on test subjects, but without similar results in study subjects. The chromosome preparation from melanocytes, however, was not adequate. There were no differences in samples from different area of skin. Only one case showed different proportion of cells altered in fibroblasts and lymphocytes, possibly due to instability of ring chromosomes in long duration cultures. Finally, only one case showed no chromosomal abnormality in mosaic, represented by a regular translocation X/autosome, for which the techniques used to study detected no explanation for the pattern of mosaicism observed clinically.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. Mosaicismo pigmentar do tipo Ito

O mosaico pigmentar (MP) tipo Ito é uma alteração pigmentar não específica, associada a alterações neurológicas, epilepsia e assimetria de órgãos e, frequentemente, está relacionada a diferentes tipos de mosaicismo cromossômico (1-4).

Em 1952, o dermatologista Minor Ito (*apud* Kuster & König e Hatchwel et al (2,5)) descreveu uma paciente com padrão extenso de despigmentação simétrica, em forma sigmóide e com manchas difusas, bilaterais (figura 1). O distúrbio foi denominado Incontinência Pigmentar Acromiante devido à similaridade com o padrão de hiperpigmentação na Incontinência Pigmentar de Bloch-Sulzberger (IP). Como se demonstrou tratar-se de um quadro clínico distinto da IP, posteriormente adotou-se o nome de Hipomelanose de Ito (HI) (2,6,7).



Figura 1. Padrão visual do MP tipo Ito nas costas. Fonte: arquivo DGM/FCM/Unicamp

Originalmente descrita como doença cutânea, relatos subsequentes associaram o quadro a manifestações extra-cutâneas, principalmente do Sistema Nervoso Central, o que levou a ser classificada como uma Doença ou Síndrome Neurocutânea (7-15).

O termo “síndrome” faz referência a múltiplas anomalias relacionadas a uma causa comum e isso não é aplicável nesse caso, além do que as alterações cutâneas e neurológicas não são encontradas em todos os casos. Com isso, muitos autores demonstraram que a condição não pode ser classificada como uma síndrome, mas sim um achado físico de etiologia indefinida, mas frequentemente associado a mosaicismo cromossômico (1-3,8,10,16-23).

Sendo assim, o termo HI como sinônimo de uma doença única também não é adequado, uma vez que não se trata de um diagnóstico exclusivo, mas sim um marcador não específico de mosaicismo (24-26).

Sugeriu-se, portanto, que Hipomelanose de Ito seja sinal clínico e não um diagnóstico e que, assim como outras alterações pigmentares, tenha uma denominação mais clara inserida num grupo de doenças heterogêneas decorrentes de diferentes estados de mosaicismo genético (2-4,12,14,18,22).

Com isso, a HI foi classificada como Mosaico pigmentar do tipo Ito ou Mosaico pigmentar do tipo hipopigmentado (2,27). Porém, frequentemente usa-se o termo hipomelanose de Ito por razões históricas (6).

Assim, **pode-se definir Mosaico Pigmentar do tipo Ito como um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por padrão de hipopigmentação da pele, geralmente seguindo as linhas de Blaschko, associado ou não com déficit neurológico, epilepsia e/ou outras anormalidades assimétricas em outros órgãos** (28-29).

O padrão de hipopigmentação reflete a presença de duas linhagens celulares com diferentes complementos de genes relacionados à pigmentação e, assim, diferentes padrões de produção de melanina, não representando isoladamente uma doença (3,7,8,10,22,30).

1.2. Mosaicismo

Mosaicismo é definido como a presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes num único indivíduo ou tecido que se originaram de um zigoto homogêneo (26,31,32).

quadro surge na embriogênese, levando à formação de duas linhagens celulares, sendo uma de clones derivados da célula em que ocorreu a alteração e outra de clones das células normais (13,30). A porcentagem de mosaicismo depende do período de desenvolvimento que surgiu a segunda linhagem celular. Se uma linhagem alterada estiver em alta proporção provavelmente haverá dismorfismos e malformações, e se o cérebro estiver incluído, desencadeará déficit intelectual. Se apenas uma pequena fração do corpo estiver envolvido ou alguns órgãos não forem afetados, o mosaicismo pode nunca ser detectado, exceto casualmente (33).

Happle (34) sugeriu que essas manifestações sejam causadas por mutações letais que só se mantêm em mosaico, pois tal associação pode se relacionar com a frequente ocorrência de trissomias cromossômicas raras, incompatíveis com a vida, que frequentemente são encontradas em mosaico entre esses indivíduos.

Muitos casos de mosaico, porém, não apresentam alteração pigmentar e por isso pode-se dizer que a presença de mosaicismo puro não explica o padrão de pigmentação anormal. Além disso, os casos descritos com as mesmas alterações cromossômicas que não estavam em mosaico não apresentaram hipo ou hiperpigmentação cutânea. Assim, sugeriu-se que essas alterações também possam ser devido a uma interação complexa entre complementos gênicos normais (17,28).

O mosaicismo cutâneo, etiologicamente, pode ser dividido em duas categorias: mosaicismo genômico e mosaicismo epigenético (35,36). Foram propostas diferentes formas de mutações que poderiam levar ao mosaicismo nesses casos, relacionados ao mosaicismo funcional resultante de inativação do X e ao mosaico genômico determinado por mutação somática, bem como mutação também poderia ocorrer no DNA mitocondrial (2,5,8,16,19,20,37-45).

Essas diferentes linhagens não são herdadas, com exceção de padrão de herança paradominante (41,46). Para o indivíduo mosaico, se o tecido gonadal estiver envolvido, sem ou com envolvimento somático, pode ser detectado apenas na próxima geração devido a anomalias congênitas ou por detecção de abortos recorrentes com a mesma alteração cromossômica (33,35).

1.2.1.- Mosaicismo cromossômico:

Estudos no período inicial da divisão embrionária seguido em fertilização *in vitro* sugerem que mosaicismo cromossômico causado por não-disjunção cromossômica, “atraso” anafásico e rearranjos estruturais estão presentes em 50% dos embriões até o estágio de oito células e 75% em blastocistos (47). Mosaicismo cromossômico também está envolvido com a causa de defeitos congênitos e retardo mental (RM), bem como algumas situações descritas como no MP tipo Ito (22) e na síndrome de Pallister-Killian (tetrassomia 12p em mosaico) (47).

Se, além da hipopigmentação, o paciente apresentar retardo mental e dismorfismos, reforça-se a hipótese da presença de aberrações cromossômicas como explicação para esse fenótipo (48).

1.2.2. Quimera:

Indivíduos quimera também são compostos por pelo menos duas linhagens celulares distintas (26), porém na quimera houve formação de dois zigotos com posterior fusão e formação de um embrião (13, 30, 35). Assim, em casos de alteração pigmentar determinado por quimera não há uma coloração normal e uma anormal, mas duas colorações diferentes determinadas por diferentes *backgrounds* genéticos (49).

1.2.3. Disrupção gênica ou de elementos regulatórios no ponto de quebra do cromossomo

Esse conceito se baseia nas diferentes alterações genéticas que interrompem a estrutura ou expressão de um gene envolvido no processo de pigmentação. Esses genes podem estar envolvidos com a migração de melanoblastos da crista neural no período fetal, função de melanócitos, incluindo síntese, transporte e degradação de melanossomos, genes que influenciem a distribuição da melanina, expressos em queratinócitos, matriz extracelular e fatores de crescimento, entre outros. (22,50).

1.2.4. Mutação somática pré ou pós zigótica

Em cada um dos vários *loci* gênicos que controlam a pigmentação da pele, o embrião pode sofrer uma mutação de ponto ou microdeleções em uma das fitas de DNA da cromátide do gameta ou uma mutação somática no início do desenvolvimento embrionário.

(13,42). Se o mosaicismo genético não for letal pode afetar células germinativas e trazer risco à próxima geração (41)

- Genes autossomos letais: São genes presentes em cromossomos autossomos que só sobrevivem em estado de mosaicismo (1,34,41,52), sendo descritos em síndromes caracterizadas por ocorrência esporádica, lesões cutâneas dispersas ou assimétricas com distribuição de mosaico, não limitadas ao padrão de Blaschko, de extensão variável, com ou sem envolvimento extra-cutâneo, e igual distribuição entre os sexos. O mosaico pode surgir de uma mutação antes da fertilização em uma cromátide de um dos gametas que formam o embrião (34) ou de um evento pós-zigótico na blastogênese que poderia levar à morte no estágio inicial de desenvolvimento se não estiverem em mosaico. Um indivíduo mosaico com esses genes não poderia transmitir a mutação a seus filhos, pois se transmitisse, não seria compatível com a vida. Ex.: síndrome de Proteus, síndrome oculocerebrocutânea, síndrome de Sturge-Weber, melanose neurocutânea.

- Perda de heterozigose: Uma mutação pós-zigótica provocaria perda da heterozigose e as células afetadas se tornariam homozigotas por recombinação mitótica, mutação de ponto ou conversão gênica, ou seriam hemizigotas devido à deleção ou a não disjunção mitótica. O heterozigoto passa a ser homozigoto. O tipo específico *twin spotting* relaciona-se a uma perda alélica, em que um indivíduo heterozigoto para duas mutações recessivas diferentes no mesmo cromossomo sofre uma recombinação somática que leva à formação de duas células-filhas homozigotas, que vão dar origem a clones com características diferentes em mosaico (41, 53, 54) Ex.: *Cutis tricolor* e neurofibromatose.

- Herança paradominante: o conceito foi proposto por Happle para explicar o acaso da recorrência familiar de mosaicismo. Indivíduos heterozigotos para a mutação paradominante seriam fenotipicamente normais, mas transmitiriam o alelo por várias gerações. O traço poderia começar a se manifestar quando ocorre uma mutação pós-zigótica do outro alelo, levando a célula a manifestar a característica e formar o mosaico (41,46). Ex.: síndrome de Sturge-Weber, telangiectasia nevóide unilateral e *nevus anemicus*.

1.2.5. Imprinting genético

O fenótipo pode ser determinado pela origem parental de genes autossomos, geralmente em casos de translocação X/autossomo balanceada, o material do cromossomo translocado é mais comumente de origem paterna (5,55). Esse é outro possível mecanismo de expressão desbalanceada de genes que pode levar à alteração pigmentar (56).

1.2.6. Mosaicismo funcional resultante do processo de lyonização ou efeito epigenéticos

O mosaicismo funcional é determinado por populações celulares estruturalmente homogêneas, mas com diferenças funcionais induzidas por fatores epigenéticos ou modificadores (35).

O processo de inativação aleatória do cromossomo X no embrião feminino é uma forma de mosaicismo funcional nas mulheres. Esse processo é regulado pelo gene *XIST*, presente no braço longo do próprio cromossomo X, e ocorre durante o estágio inicial de blastocisto. Alguns genes escapam da inativação e se mantêm ativos, como a região em Xp11.21 a Xp11.22 (57,58).

A distribuição aleatória de dois clones celulares com diferente padrão de inativação pode resultar em variabilidade fenotípica de doenças ligadas ao X em mulheres (35).

Se houver uma translocação X/A, em geral ocorrerá inativação preferencial do cromossomo X normal. A proliferação preferencial de células com o X normal inativo minimiza, mas não elimina, as consequências clínicas de defeitos cromossômicos particulares como em casos em que haja disrupção de genes nessa região ou que o X derivado não seja portador de mutações (59). Esse mecanismo preserva a expressão dos genes autossômicos presentes no X derivado.

Em células em que o X derivado é inativado, a porção do Xp translocado no autossomo não é inativada devido à separação física com o centro de inativação do X, presente no braço q, provocando uma dissomia funcional dos genes presentes nessa região. Possivelmente poderá ocorrer mosossomia parcial de genes autossomos próximos ao ponto de quebra devido à propagação do processo de inativação do X derivado (Figura 2) (22,41,60,61).

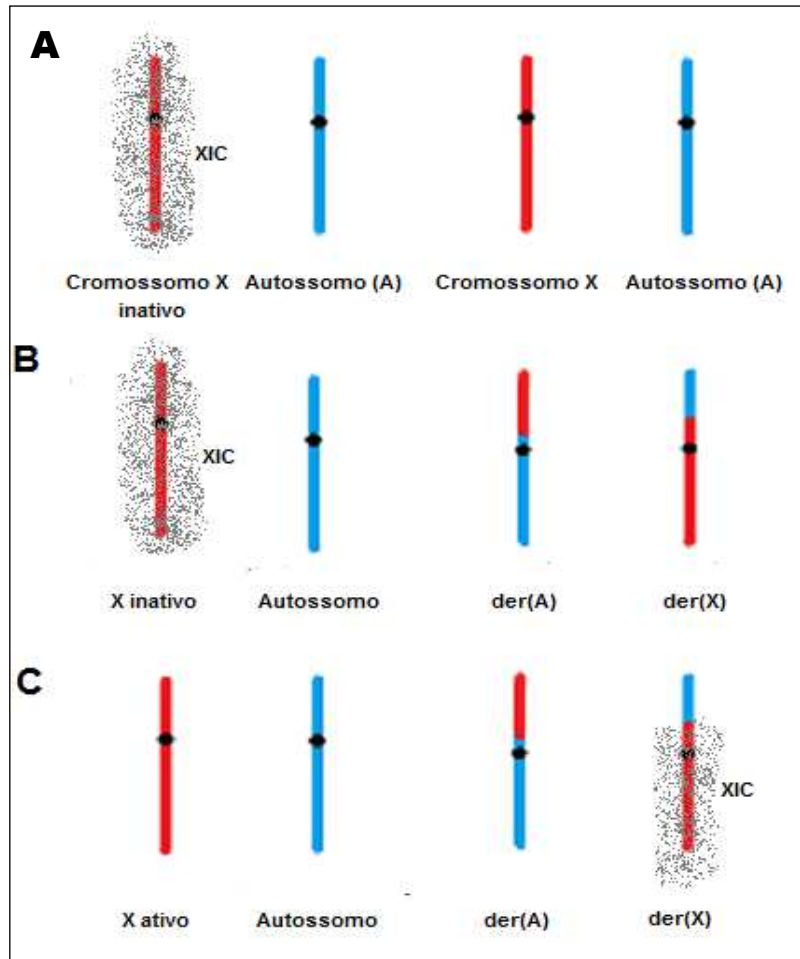


Figura 2: Padrão de inativação do cromossomo X em mulheres com cariótipo normal e em portadoras de translocação X/autossomo balanceada. Em mulheres com cariótipo normal há uma cópia do cromossomo X inativo e um ativo (A). Em mulheres portadoras de translocação X/autossomo balanceada podem ocorrer duas situações: O cromossomo normal é inativado (com exceção do *loci* que sempre escapa à inativação) (B) preservando-se assim as duas cópias do cromossomo autossomo envolvido na translocação e resultando em uma cópia ativa de Xp e uma de Xq. Outra possibilidade é o cromossomo derivado de X ser inativado (C) resultando em duas cópias de Xp funcionalmente ativas, uma no X íntegro e uma no der X (da região distal até o ponto de quebra em Xp). O Xp do derivado é funcional por estar fisicamente desconectado do centro de inativação do X (XIC). Em adição à dissomia funcional de Xp, é possível que haja monossomia funcional variável da sequência do autossomo, devido à propagação da inativação do derivado de X.

Quando há falha no processo de inativação e o padrão aleatório dos cromossomos X é mantido, haverá distúrbio no padrão de expressão de genes relacionados à pigmentação envolvidos nessas regiões. Podem ocorrer duas situações:

- a- Dissomia funcional de X: A dissomia funcional de genes do cromossomo X poderia explicar a pigmentação anormal se genes de pigmentação ligados a X estiverem envolvidos. Nesse caso, esses genes seriam hiper-expressos.
- b- Monossomia funcional de regiões do autossomo envolvido: Em translocações balanceadas X/autossomo, o cromossomo X pode estender a inativação ao autossomo translocado, provocando monossomia funcional desses genes do autossomo.

1.3. Mosaicismo pigmentar

Mosaico Pigmentar (MP) define um fenótipo cutâneo inespecífico, geralmente de ocorrência esporádica e frequentemente associado a anomalias extra-cutâneas, que determinam um quadro clínico heterogêneo (3,8,13,62,63). O termo inclui diferentes padrões de hipopigmentação ou hiperpigmentação cutânea que seriam explicadas por alterações genéticas que interrompem a expressão ou função de genes de pigmentação.

Uma associação não aleatória foi sugerida entre mosaicismo e pigmentação anormal da pele, sendo o termo mosaico pigmentar usado para salientar que as lesões da pele são um reflexo do mosaicismo somático (4,8,10,16-18,22,41,62, 64). Sugere-se que o surgimento de duas linhagens celulares no início do desenvolvimento embrionário, com diferente padrão de expressão de genes associados à pigmentação, possa levar à presença de alterações cutâneas hipopigmentadas ou hiperpigmentadas (3,65).

Além disso, diferenças na proliferação, na migração dos clones ou no período de origem do mosaicismo podem produzir padrões cutâneos distintos (3,16-17, 41, 66-67).

Foram descritos cinco padrões de pigmentação que são considerados manifestação de mosaicismo (Figura 3) (35).

- Padrão seguindo as linhas de Blaschko. Ex.: incontinência pigmentar

- Padrão melanocítico nevíde em “tabuleiro de xadrez” Ex.: Nevo de Becker
- Padrão filóide Ex.: trissomia do cromossomo 13 em mosaico
- Padrão irregular sem separação na linha media. Ex.: nevo melanocítico gigante congênito
- Padrão lateral Ex.: síndrome CHILD (*congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects*)

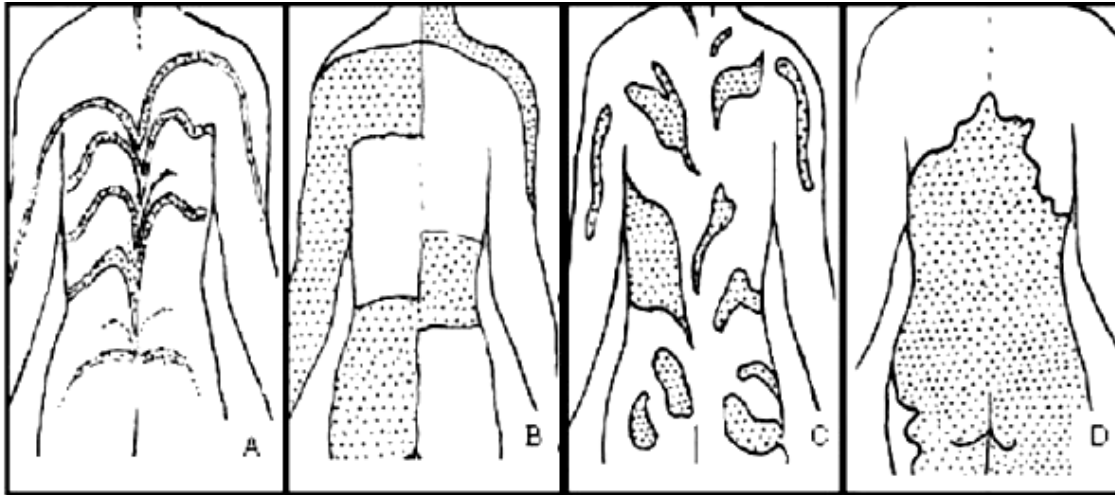


Figura 3: Exemplos de padrões de pigmentação associados a Mosaico pigmentar. A. Linhas de Blaschko; B. Padrão em “tabuleiro de xadrez”; C. Padrão filóide; D. Padrão irregular sem separação na linha media. A figura não exemplifica o padrão lateral. Fonte: Happle, 1993(41).

O fenótipo geralmente ocorre *de novo*, como resultado de mutação pós-zigótica, seja cromossômica ou gênica, ou por inativação aleatória de X em associação com defeitos genéticos localizados nesse cromossomo (3,4,62,65).

Considerou-se que o mosaicismo cromossômico está presente em cerca de 60% dos pacientes com MP (24). Entre as alterações cromossômicas foram relatados diversos tipos de aberrações associadas às diferentes formas de mosaicismo pigmentar (10,12,68).

Essas alterações podem levar à disfunção de grande número de genes localizados em diferentes cromossomos e envolvidos no processo de pigmentação. Essa suposição é embasada pelo fato de que uma extensa lista de genes relacionados à pigmentação está em *loci* que se sobrepõem às alterações cromossômicas descritas em MP (22,64,69).

Não se pode determinar porque diferentes anomalias genéticas causam padrão similar de alteração cutânea (30).

Além dos casos com alterações cromossômicas evidentes, alguns tipos de mosaico pigmentar podem ser desencadeados por alterações cromossômicas ou moleculares que não são detectáveis por citogenética convencional, como pequenas deleções e mutações de ponto (3). Além das alterações cutâneas, em pacientes que apresentem distúrbios de crescimento e assimetria, retardo de desenvolvimento e cariótipo normal deve-se suspeitar de mosaicismo de alteração submicroscópica ou em outros tecidos (16,18,22,47,67,70).

1.4. Linhas de Blaschko

Em 1901, Alfred Blaschko (*apud* Kuster & König e Nehal et al (2, 12)), dermatologista alemão, documentou em 100 pacientes um padrão cutâneo específico seguido por muitos nevos e alterações cutâneas genéticas.

O padrão observado de manchas pigmentares e atualmente conhecido por linhas de Blaschko é caracterizado por linhas em "V" sobre a coluna vertebral, formas de "S" sobre a costela, linhas pontiagudas no abdomen e lineares nos membros. Pode ocorrer de forma bilateral ou, mais frequentemente, unilateral (2,28,71). O esquema desenhado por Blaschko foi revisado por Jackson (72), que sugeriu a associação a mosaicismo cromossômico, e por Happle et al que acrescentaram as alterações presentes na nuca e cabeça (73) (Figura 4).

Montgomery, em 1901 (*apud* Niessen et al e Moss et al (30, 40)), excluiu vários candidatos anatômicos que pudessem determinar esse padrão cutâneo, como áreas vasculares e linfáticas, e concluiu que essas linhas refletem a tendência de migração de células e crescimento no desenvolvimento embrionário.

Essa hipótese foi apoiada por estudos de migração de melanócitos e queratinócitos em animais. Estudos com quimera em camundongos demonstraram que, no desenvolvimento embrionário inicial, as células precursoras de melanoblastos se arranjam ao longo da crista neural e migram num padrão análogo às linhas de Blaschko (40,66,74). O padrão é estabelecido antes do fechamento do tubo neural, até o oitavo dia nos camundongos, que equivale a 22 dias em humanos (66). Esses estudos ofereceram uma explicação satisfatória para o padrão de pigmentação da pele visto em mosaico pigmentar (16,38).

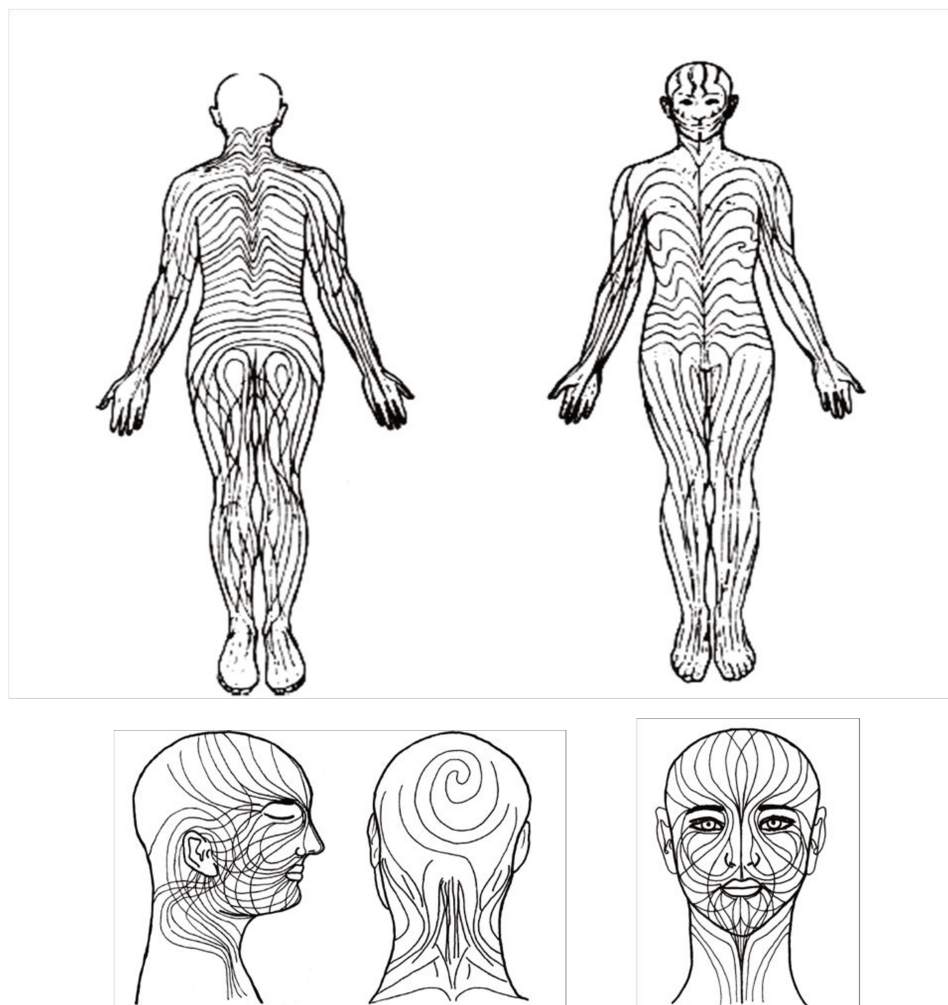


Figura 4. Esquema representativo das linhas de Blaschko. Acima, diagrama original do padrão descrito por Blaschko, extraído de Findlay et al, 1993(71). Abaixo, diagrama da revisão realizada por Happle et al, 2001 (73).

Assim, a teoria mais aceita é de que as linhas representam a rota de migração de duas linhagens celulares diferentes presentes na ectoderme (75,76). Se duas linhagens celulares com diferentes complementos de genes relacionados à pigmentação forem estabelecidas antes de 16 dias do desenvolvimento embrionário, a distribuição, migração e proliferação das células formam as linhas de Blaschko. Estas linhas refletem o processo não aleatório da distribuição das células embrionárias, e são a expressão cutânea do mosaicismo genético (3,13,18,39,40,68,77). Dessa forma, essas linhas denotam diferentes linhagens celulares que podem variar em proporção nos diversos tecidos do indivíduo (63,69,78).

Diferentes alterações cutâneas seguem as linhas de Blaschko. Publicações conflitantes, heterogeneidade de achados extra-cutâneos e discordância entre as terminologias causam muita confusão entre elas (12,14,79). Hipo e hiperpigmentação com esse padrão de distribuição foram relatados em muitas condições que podem estar associadas a fatores extra-cutâneos, presença de anomalias cromossômicas ou gênicas (12,14), bem como em crianças com desenvolvimento normal (1,17,25).

Nehal et al (12) analisaram os sinais e sintomas de 54 pacientes com hipo/hiperpigmentação ao longo das linhas de Blaschko e estimaram a presença de fatores extracutâneos em 16 indivíduos (30%). Este estudo sugeriu que assimetria de MMII e alterações cutâneas seguindo as linhas de Blaschko sejam características do quadro de mosaicismo, sendo os demais achados devido à alteração genética envolvida (19). Assim, sugere-se que essas alterações cutâneas representam um conjunto de distúrbios com mosaicismo como fator comum e propôs o uso de termos descritivos como hipo ou hiperpigmentação seguindo as linhas de Blaschko (12,30).

1.5. Embriogênese e células da ectoderme: melanócitos e queratinócitos

Durante o desenvolvimento embrionário, a ectoderme dará origem à epiderme e aos anexos epidérmicos, além do esmalte dos dentes, da orelha interna e do cristalino. A neuroectoderme dará origem à crista neural (Sistema Nervoso Periférico e melanócitos) e ao tubo neural (Sistema Nervoso Central e retina) (75,80).

A epiderme é composta principalmente por células epiteliais escamosas ou queratinócitos, derivados da ectoderme superficial. Essas células migram e se proliferam em direção à face externa da pele, produzem a queratina e as citocinas que regulam as células epidérmicas e dérmicas adjacentes.

Junto à membrana basal da epiderme, intercaladas regularmente entre os queratinócitos, encontram-se células dendríticas chamadas melanócitos (26). Durante o desenvolvimento fetal, melanoblastos indiferenciados migram da crista neural, invadem a epiderme por migração durante os três primeiros meses do desenvolvimento embrionário e a habitam como população fixa (26,75,81). Sua principal função é sintetizar a melanina a partir da tirosina, processo chamado melanogênese, e transferi-la aos queratinócitos através

dos dendritos. Alterações nos melanócitos que interfiram em sua capacidade de produzir e distribuir a melanina resultam em hipo ou hiperpigmentação da pele (82) (Figura 5).

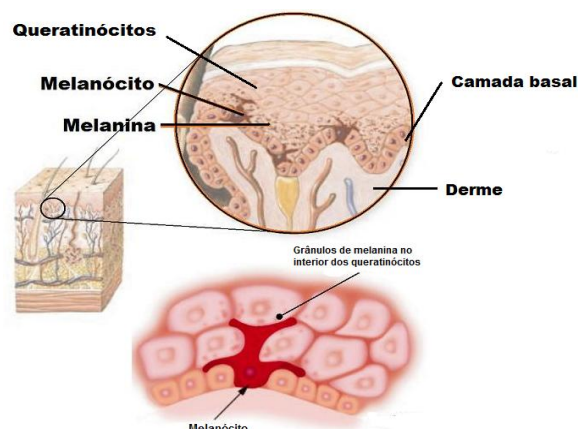


Figura 5. Representação da pele humana, com destaque para a epiderme. Atentar para a proporção e interação entre melanócitos e queratinócitos na produção e distribuição dos grânulos de melanina. Fonte: Modificado de <http://www.medicinageriatrica.com.br>.

Os melanócitos são pouco replicados em tecido normal e constituem a menor porção de células da epiderme (cerca de 1 a 3%), na proporção de 35:1 para queratinócitos (83).

1.6. Aspectos clínicos do MP tipo Ito

O MP tipo Ito caracteriza-se visualmente por áreas lineares hipopigmentadas ou despigmentadas na pele, seguindo o padrão das linhas de Blaschko (figura 6). Predominam no tronco e nos membros preservando as palmas das mãos e dos pés, além das mucosas. Frequentemente envolvem mais de dois segmentos do corpo, são visíveis ao nascimento ou infância e podem se estabilizar, diminuir ou aumentar com o tempo (2,7,8,11,13,84).

Há casos descritos na literatura em que as manchas não seguem as linhas de Blaschko, mas foram diagnosticados como MP tipo Ito (39). Lesões inespecíficas foram relatadas em 20 a 40% dos indivíduos, a maioria são manchas café com leite, nevo marmoráceo, nevo angiomatoso, nevo de Ota e nevos azulados (manchas mongóis) (85-87).

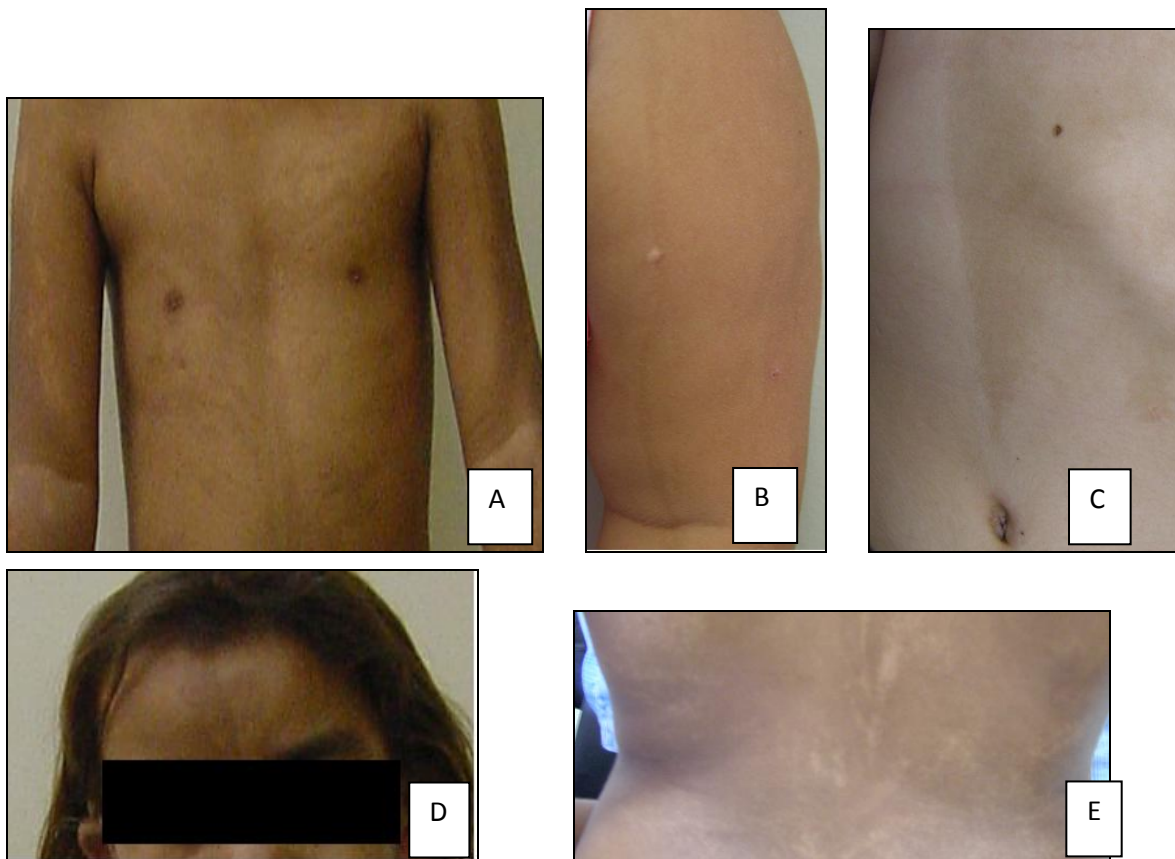


Figura 6. Fotos de pacientes com MP do tipo Ito, arquivo do DGM/FCM/Unicamp. Manchas de hipopigmentação seguindo as linhas de Blaschko no tórax e membros (A e B), bilaterais ou com limitação na linha média (C e D), e manchas inespecíficas nas costas (E).

As manifestações cutâneas são consideradas determinantes para o diagnóstico (8). As lesões típicas são notadas no nascimento em 54% dos pacientes ou se iniciam no primeiro ano de vida em cerca de 70% dos casos (23). A extensão da hipopigmentação não se relaciona com a gravidade neurológica ou com os achados histológicos (7,9).

Foi sugerido classificar o MP tipo Ito em dois tipos: com ou sem envolvimento sistêmico (28,88,89), enquanto alguns autores consideraram o termo MP tipo Ito apenas quando associado a déficits neurológicos (65).

Os casos relatados demonstraram grande heterogeneidade clínica e diversas anomalias congênitas associadas, o que não surpreende diante da variabilidade de mosaicismos cromossômicos (2,5,21,76). Entretanto, ainda não é claro como a grande variedade de alterações cromossômicas pode levar a fenótipos similares (90-91).

Embora alguns pacientes descritos apresentem apenas alterações cutâneas, variam de 30 a 94% os casos relatados na literatura que apresentam associação com anomalias sistêmicas. As publicações iniciais citavam incidência de 70 a 90%, porém dados mais recentes sugerem que a associação com anomalias extra-cutâneas é de aproximadamente 30% (12,13,79).

Essa variação pode ser explicada por viés de dados obtidos a partir de publicações de relatos de casos, que tendem a descrever casos mais dramáticos ou incomuns de doenças ou que procuraram especialistas, o que já prevê uma alteração a mais, aumentando a frequência de achados extracutâneos. Além disso, o critério diagnóstico proposto por Ruiz Maldonado et al (11) restringe a análise àqueles pacientes que tem envolvimento da pele de um ou mais dermatômos. Já o estudo de Nehal et al (12) incluiu todos os pacientes com estrias lineares congênitas.

Devido à variabilidade clínica, inconsistência do critério diagnóstico e dificuldade de definir como hipopigmentação ou hiperpigmentação, alguns casos são difíceis de diagnosticar (10,80).

Em 1992, Ruiz Maldonado et al (11) propuseram critérios diagnósticos para o MP tipo Ito. Estes têm sido questionados por alguns autores, que justificam não haver dados específicos para o diagnóstico de um fenótipo relacionado a mosaicismos genéticos variados. Ruggieri e Pavone (14) propuseram que quando as lesões cutâneas são extensas e têm distribuição ‘blashkoide’, independente das manifestações extracutâneas, são características suficientes para ser considerada uma entidade independente.

Sybert (24) relata que devido à não uniformidade do critério diagnóstico, outras hipopigmentações poderiam ser erroneamente classificadas como MP tipo Ito e propõe que o termo seja utilizado apenas em casos que correspondem aos critérios descritos por Ruiz-Maldonado et al (11). Esses critérios diagnósticos incluem:

- Critérios principais:
 - a- Hipopigmentação cutânea em linhas ou manchas em pelo menos dois segmentos do corpo, não hereditárias, congênitas ou adquiridas na infância;
 - b- uma ou mais anomalias de sistema nervoso ou músculo-esquelético.

- Critérios secundários:
 - a- duas ou mais outras malformações congênitas, excluindo sistema nervoso ou sistema músculo esquelético;
 - b- anomalias cromossômicas

O diagnóstico definitivo pode ser feito na presença de dois critérios principais ou um principal e dois secundários. Suspeita-se na presença de um sinal principal ou na presença de um principal e um secundário.

Aproximadamente 76% dos pacientes apresentam alterações neurológicas, sendo que em alguns estudos as mesmas estão presentes em todos os pacientes relatados. Em diversos artigos revisados foram encontradas alterações fenotípicas variadas. As principais estão listadas a seguir (2-3, 6,7, 9-10,14,20,23,76,84-85,87,92-98).

1.6.1. Alterações neurológicas

Considera-se o envolvimento do SNC o mais frequente, presente em mais de 50% dos casos. Associou-se MP tipo Ito a RM, atraso no desenvolvimento e convulsões.

- RM: frequência de 60% dos pacientes, variando de leve a grave;
- Convulsões/epilepsia: frequência de 37 a 53%, sendo 50 a 70% dos casos em associação a RM, outros apresentam inteligência normal. São comuns espasmos na infância;
- Retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM): frequência de 78%;
- Comportamento autista: frequência de 10%. A associação de distúrbios de hipopigmentação com autismo pode relacionar processos etiológicos na migração de células precursoras na embriogênese com o surgimento de problemas de desenvolvimento neurológico (20, 99-101).
- Outros: ataxia, neuropatias, psicose, micro ou macrocefalia, atrofia muscular espinhal distal, espinha bífida oculta, hemimegalencefalia, meduloblastoma, malformações corticais, atrofia cerebral local ou generalizada, cistos bilaterais, defeitos de migração neuronal, hipoplasia cerebelar, alterações na substância branca, ventriculomegalia.

1.6.2. Sistema músculo esquelético

É o segundo sistema onde as complicações são mais frequentes, estando presentes em 58% dos casos (11).

- Baixa estatura;
- Assimetria facial e de membros;
- Defeitos nos dedos das mãos e pés: polegar bífido, clinodactilia, sindactilia;
- Alterações dentárias: má oclusão, displasia e hipoplasia dentária;
- Escoliose e deformidade torácica;
- Hipotonia;
- Hemiatrofia facial.

1.6.3. Alterações oftalmológicas

Em frequência, correspondem ao terceiro grupo de envolvimento extra-cutâneo. As alterações são variáveis.

- Miopia;
- Estrabismo;
- Microftalmia, hipertelorismo
- Melanose de esclera;
- Atrofia óptica;
- Opacificação da córnea;
- Degeneração e anomalias na pigmentação da retina;
- Microcórnea;
- Nistagmo;
- Catarata.

1.6.4. Outros

- Retrognatia;
- Braquicefalia;
- Surdez;
- Hipoplasia das mamas;
- Malformações cardíacas e genitourinárias;
- Alterações no crescimento e coloração do cabelo, alopecia, hipertricose;

- tumores benignos e malignos;
- Hirsutismo;
- Puberdade precoce;
- micropênis, testículos não descidos
- hérnia umbilical e inguinal.

1.6.5. Achados histológicos

Em diferentes estudos, a avaliação histológica mostrou, como característica mais consistente, a redução do número de melanócitos e de melanossomos, além do aumento do número de células de Langerhans. Com isso, há ausência ou déficit de melanina nas áreas hipopigmentadas da epiderme (26,80,102-103).

Além disso, os melanócitos apresentaram diminuição da atividade funcional, a área próxima aos melanócitos apresentou redução ou ausência de dendritos e a transferência de melanossomos aos queratinócitos se mostrou prejudicada (2,104). O estudo de Vergine et al (105) também demonstrou diminuição do número de queratinócitos.

1.7. Alterações cromossômicas

Assim como caracterizado para MP, o tipo Ito também se relaciona com diversos tipos de mosaicismo, não havendo uma base genética comum para essa condição (20). Flannery et al (17) associaram mosaicismo cromossômico com MP do tipo Ito, reiterando a relação entre alterações pigmentares ao longo das linhas de Blaschko com mosaicismo (8,24,40,41).

É frequente a associação do fenótipo com diversas aberrações cromossômicas, envolvendo quase todos os cromossomos, o que corresponde à variabilidade fenotípica (5,22,41,86).

O mapeamento do ponto de quebra nos casos de translocação cromossômica pode contribuir na identificação de genes específicos e necessários para o desenvolvimento da crista neural e função dos melanócitos (106). Entre eles estão os genes envolvidos na pigmentação, os que controlam a migração do melanoblasto na crista neural, os

relacionados à função do melanócito (síntese, transporte e degradação dos melanossomos) e os genes que interferem na sua função junto aos queratinócitos.

De acordo com a revisão de Taijbee et al (22) foram identificados mais de 70 genes candidatos envolvidos nesse processo e 88% das alterações cromossômicas encontradas em MP descritas na literatura sobrepõem um ou mais desses genes. A variação na expressão desses genes devido a trissomia ou monossomia justifica esse fenótipo, e os vários genes envolvidos explica as várias formas de aberrações cromossômicas descritas(2,3,5,18,30,40). Algumas aberrações cromossômicas relatadas em MP estão listadas na tabela I.

Tabela I. Aberrações cromossômicas encontradas em MP tipo Ito. Revisão da literatura*

Cromossomo	Alteração	Referência
1	46,XX,t(1;6)(p32;q13)	(103)
	46,XY,t(1;9)(q21ou q23;q22)/46,XY	(106)
2	46,XY,del(2)(q32.2q33.1)	(107)
	46, XY, 9+, 2q+a	(11)
	46,XX,t(2,8)(q37.2;p21.1)	(108)
	46,N/46,dir dup(2)(q31-.q37.1)	(33)
	47,XX,+2/46,XX	(76)
3	46,N/46,dir dup(3)(q23-q27)	(33)
	46,XY,dup(3)(p21.3;pter)/46,XY	(3)
	46,XY,trp(3)(q27.1-qter)[47]/46,XY[4].	(109)
4	46,XX/46,XX, 4p+	(16)
	46,XX/46,XX t(4;5)(q31;q35)	(77)
	46,fra(X)/46,t(4;20)(p16;q13)	(33)
5	46,XX/47,XX, i(5p)	(110)
	46,XX/46,XX t(4;5)(q31;q35)/	(77)
	46,N/46,t(5;18)(p15;q21)	(33)
	47,XX,5p+ (tetrasomia)	(65)
	46,X, t(X;5)(p11.2; q35.2)	(111)
6	46,XX,t(1;6)(p32;q13)	(103)
7	46,XY/46, XY, +7	(40, 32,67,112)
	45,XX,-7/46,XX, r(7)	(113)
	46,XY/45,XY, -7,-15, + der(7)t(7;11)(q34;q13)	(50)
	46,XX/46,XX, inv(7)(p14q36)	(77)
	46,XX/47,XX +7	(30, 65,22)
	46,XX/47,XY,+7/47,XY,+r(7)/48,XY,+7,+r(7)	(68)
8	46,XY/47,XY + 8q-	(114)
	46,XX/46,XX, del(8)(q21q24)	(77)
	46,XX,t(2,8)(q37.2;p21.1)	(108)
	t(8;16)(q24.3;p13.3)	(20)
	46,N/46,dir dup(8)(q21 -*q22)	(33)

Cromossomo	Alteração	Referência
9	46,XY, 9+, 2q+a	(11)
	46,XX / 46,XX,t(9;9)(p24;p24)	(115)
	45,X,inv(9)(p13q12) / 46,X,del(X)(q21),inv(9)	(77)
	46,X, t(X;9)(p11.21;q33.2)	(116)
	46,X,t(X;9)(p11;q34)	(117)
	46,X, t(X;9)(p21;q34)	(118)
	46,X, t(X; 9)(p11.21; q34.1	(27)
	47,XX,+9[3]/45,XX,-9[1]/46,XX[27]	(47)
	47,XX,+9[10]/46,XX[50]	(47)
	46,XY,t(1;9)(q21or q23;q22)/46,XY 50	(106)
10	46,XX,r(10)	(119)
	46,X,t(X;10)(p11;q11)	(91)
	46,XX/47,XX,+del(10)(q11.2q23.2)	(120)
	46,XY/46,XY,del(10)(q.22.2 - 24.2)	(26)
	46,X,t(X;10)(p11.2q22)	(121)
11	46,XX / 46,XX t(11;19)(q21;p13.1)	(77)
	46,N/46,t(11;22)(q23;q21)	(33)
12	46,XX / 47,XX,+12	(122)
	46,XY / 46,XY,dup(12)(q22q13)	(21)
	46,N/46,t(3;12;17)(p21;q13;p13)	(33)
13	46,XX / 47,XX,+13 / 47,XX,+18	(123)
	46,XX / 46,XX,-13,+mar	(40)
	46,X,t(X;13)(q10;q10)	(124)
	46,X,t(X;13)(Xp13q; Xq13p)	(78)
	46,XX / 46,XX,del(13)(q11)	(119)
	46,X,t(X;13)(p11.21;q12.3)	(125)
14	46,XX / 47,XX,+14	(22, 126-127)
	45,XX,-14 / 46,XX,r(14)	(128)
	46,XX / 46,XX,add(14)(q32),dup(14)(q32p13)	(129)
	45,XY,t(14q21q) / 46,XY,t(14q21q), +mar	(130)
	46,XX / 46,XX,r(14) / 46,XX, t(14q;14q) / 45,XX,-14	(131)
	47,XX,+14[4]/46,XX[58]	(47)
	46,XX/47,XX,+14	(39)
	46,XX,der(14;14)(q10;q10),+14[3]/46,XX[97]	(47)
	46,XX,r(14)/46,XX,t(14q;14q)	(131)
	46,XX/45,XX,-4/46,XX,pseudic14q/46,XX,r(14)	(16)
	45,X/45,X,-15, t(X;15)	(132)
15	46,X,t(X;15)	(11)
	46,XX / 45,XX,t(15;22)	(119)
	46, XY/45,XY,-7-15, +der(7)t(7;15)(q34;q13)	(50)
	46,XX / 46,XX,t(14;15)(q11;p11)	(133)
	46,XX / 46,XX,del(15)(q1)(q11 or q13)	(134)
	46,XX / 47,XX,+dic(15)(q13,q15)	(22)
	46,XY/46,XX, r(15)(15q;15q)	(135)
	46,N/47,+inv dup(15)	(33)

Cromossomo	Alteração	Referência
	46,XX,del(15q)	(162)
16	t(8;16)(q24.3;p13.3)	(20)
17	46,X,t(X;17)	(5, 137)
	46,X,t(X;17)(q13;p13)	(136)
	46,X,t(X;17)(q12;p13)	(138)
	46,X,t(X;17)(p11.2;q11.2)	(116)
	46,N/46,t(3;12;17)(p21;q13;p13)	(33)
	46,N/46,del(17)(p1 1.2p1 1.2)	(33)
18	46,XY/47,XY,+18	(39, 119, 139-141),
	46,XX/47,XX,+18	(141-145)
	46,XX/47,XX,+18/47,XX,+13	(123)
	46,XY/45,XY,-18	(114)
	46,XY/47,XY,+18/92,XXYY	(146)
	46, XX ,18 + del(18)(p11.23-pter)/46 XX)18 + idic(18)(p11.23)46 XX)18 +r(18)	(19)
	46,XX/46,XX,18p-	(77)
	46,XX,del(18q)	(22)
	46,XX,del(18)(q21q23)/47,XX,del(18)(q21q23) +mar	(77)
	46,X,t(X;18)(p11;q23)	(147)
	46,N/46,t(5;18)(p15;q2 1)	(33)
	46,XY/92,XXYY/47,XY,+18	(146)
19	46,XY,45,XY,+19	(114)
	46,X,t(X;19)	(148)
	46, XX/46,XX,t(11;19)(q21; p13.1)	(77)
	46,XX,r(19)	(149)
20	46,XX/47,XX ,+20	(25, 150)
	46,fra(X)/46,t(4;20)(p16;q13)	(33)
	46,N/46,r(20)	(33)
21	45,XY,(14q21q)/46,XY,t(14q21q), +mar	(50, 130)
22	46,XX/47,XX,+22	(77)
	46,XY/46,XY,r(22)	(1)
	46,XX/46,XX, r(22)	(77),
	45,XX,t(15;22)/46,XX (19:1)	(136)
	46,X,t(X; 22)(q11.2;q13.3)	(130)
	47,XY,+22 [28]/46,XY [2]	(151)
	46,N/46,t(111;22)(q23;q21)	(33)
X	46,XX/47,XX,+r(X)(p21.3q13)	(152)
	45,X/46,XX	(40, 114)
	45,X/46,XY	(16, 114, 131)
	45,X/46,X,r(X)	(11, 153-154)
	46,XX/45,X/46,X, r(X)	(155)
	45, X/46,X,del(X)	(16, 131)
	46,X,t(X:9)(p11.21;q33.2)	(156)
	46,X,t(X:9)(p11;q34)	(156)
	46,X, t(X;15)	(11)

Cromossomo	Alteração	Referência
	46,X,t(X;17)	(5, 137)
	46,X,t(X;13)(p11.21;q12.3)	(125)
	46,X,t(X;13)(Xp13q;Xq13p)[50]	(78)
	45,X/46,X,del(X)	(131)
	46,X,t(X;9)(p11;q34)	(117)
	46,X,t(X;10)(p11;q11)	(91)
	46,X, t(X; 9)(p11.21; q34.1).	(27)
	46,X,t(X;22)(q11.2;q13.3)	(18,119)
	46,X,t(X;18)(p11;q23)	(19)
	46,X,t(X;17)(p11.2q11.2)	(116)
	46,X,t(X;5)(p11.2;q35.2)	(111)
	46,X,t(X;10)(p11.2q22)	(121)
	46,X,t(X;9)(p11.21;q33.2)	(116)
	46,X, r(X)(p11.22;q12.2q13.1)	(157)
	46,X,t(X;9)(p21;q34)	(118)
	46,X,t(X;13)(q10;q10)	(124)
	46,X,t(X;17)(q12;p13)	(138)
	46,X,t(X;17)(q13;p13)	(136)
	46,XX/46,X,r(X)/45,X	(16, 40, 155)
	45,X/46,X,r(?X)	(18, 155)
	45,X/46,X,r(X)	(11,154)
	46,XX/47,XX,+r(X)(p21.3q13)93%;7%	(18)
ploidias	69,XXX/46,XX	(8,131)
	69,XXY[29]/45,XY[1]	(77)
	46,XX/69,XXX/92,XXXX	(158)
marcadores	46,N/47,+ mar [7%]	(33, 39, 77, 152)
	46,XX,-13,+mar	(33, 40)
	47,XYY/48,XYY,+8(L)48,XYY,+8	(16)

* Os cariótipos foram transcritos conforme publicação

Alterações no cromossomo X foram descritas em até 60% dos casos com alteração cromossômica, seja estrutural ou numérica, em mosaico ou não (91,159).

Enquanto não há um padrão evidente de cromossomos específicos envolvidos, existe um subgrupo de mulheres em que há um fator comum, a presença de uma translocação X/autossomo balanceada com ponto de quebra na região pericentromérica de X (Xp11, Xp11.2, Xp11.21 e Xp11.22) (5, 117, 121, 152). O fenótipo parece estar relacionado com a presença de monossomia funcional de genes do autossomo, pela dissomia funcional em mosaico de genes de X, ou disrupção gênica (5, 20, 22, 27).

Existe forte evidência do papel da dissomia funcional de Xp na patogênese do MP tipo Ito, conceito inicialmente introduzido por Hatchwell et al (5). Casos de MP tipo Ito com translocação X/autossomo, podem refletir a falha na inativação de X devido à separação física do *locus* de inativação em X pela translocação, ou pelo escape de algumas regiões com genes ligados ao X que deveriam ser expressos por somente um cromossomo X ativo (2).

Na revisão realizada por Taijbee et al (22) as alterações cariotípicas foram encontradas em 30 a 60 % dos casos diagnosticados clinicamente como hipermelanose com manchas difusas e lineares (LWH) ou MP tipo Ito. Alguns autores sugerem que os casos nos quais não foi identificado mosaicismos se devam ao número limitado de células testadas, à dificuldade para detectar pequenas alterações cromossômicas por análise citogenética ou tipo celular analisado (18,21,22).

Assim, considera-se que o cariótipo normal em linfócitos não exclui a presença de alteração cromossômica. Nesses casos sugere-se biópsia de pele para cariótipo de fibroblastos, preferencialmente dos dois lados do corpo ou de áreas de diferente pigmentação (16-18,21,28,47,48,96).

Porém, apesar de em cerca de 60% dos casos o mosaicismos ser encontrado somente em fibroblastos, nem sempre pode ser demonstrado nesse tecido (16,32). Nos casos em que o mosaicismos é detectado nesse tipo de célula, cuja origem embriológica é a mesoderme, poderia se explicar alguns fatores fenotípicos relacionados a essa origem embriológica, como anomalias esqueléticas (29,40).

Em muitos estudos em que foi realizado cariótipo de fibroblastos de tecido da pele normal e hipopigmentada foi encontrado o mesmo padrão citogenético para as duas regiões, ou seja, não houve correlação entre o tecido e os achados citogenéticos (8,16,18,21,32,39,40,44). Assim, a seleção da área de biópsia não serve de guia para a localização da alteração, mas a biópsia de mais de uma região pode ser necessária para identificar a alteração em fibroblastos (21).

Além disso, os fibroblastos têm origem mesodérmica e, assim, não se distribuem seguindo as linhas de Blaschko no desenvolvimento embrionário como os derivados ectodérmicos, o que pode justificar a ausência de aberrações cromossômicas nesse tipo celular em alguns casos (1,10,16,18,25,26,158).

Considera-se que, nesses casos, a alteração em mosaico poderia ser identificada a partir de derivados ectodérmicos, como melanócitos e queratinócitos (29,39,44,77). Alterações genéticas presentes nesses tipos celulares explicariam o comum envolvimento do SNC e da epiderme, derivados da ectoderme, nessa condição, e poderiam direcionar o prognóstico neurológico (21,29,40). Por exemplo, a presença de mosaicismo em fibroblastos não detectada em queratinócitos poderia estar associada a um melhor prognóstico neurológico.

Assim, as células de origem ectodérmica, principalmente as envolvidas no processo de pigmentação, seriam mais fidedignas na pesquisa das alterações cutâneas, sobretudo os melanócitos, prováveis portadores do defeito bioquímico (2,10,18,21,22,39,40,77).

O estudo de Lacour et al (148) com uma criança apresentando t(X;19) balanceada não mosaico, demonstrou através de estudo funcional de mRNA, que a alteração cutânea era devido à baixa resposta ao hormônio estimulante de melanócitos (MSH) na pele envolvida. A baixa resposta ao hormônio levou à diminuição da síntese de melanina em melanócitos afetados, a alteração foi encontrada em todos os melanócitos e fibroblastos. Como não foi demonstrado mosaicismo, sugeriu-se que esse fator poderia estar confinado a queratinócitos, tipos celulares esses que não foram estudados nessa criança.

Já foi demonstrado que a análise de queratinócitos tem melhor correlação com a alteração cutânea com as regiões claras e escuras do que fibroblastos, porém não se demonstrou alterações citogenéticas nesse tipo celular em todos os casos (29,44).

Embriologicamente, queratinócitos tem a mesma origem do SNC, e melanócitos derivam tardiamente da crista neural e, por isso, é possível que a linhagem anormal se torne mais escassa nos queratinócitos e no tecido cerebral, e mais abundante nos derivados da mesoderme e da crista neural, em que se incluem os melanócitos (40). Dessa forma, o melhor seria a investigação de melanócitos, que ainda não foi estabelecida devido às dificuldades em estabelecer cultura dessas células, mas sugere-se que futuramente seja um teste eficiente (2,40).

Assim, seria indicada a análise cromossômica de diferentes tecidos para identificar possíveis alterações confinadas a determinados tecidos. A análise deve ser para pesquisa de mosaicismo, ou seja, pelo menos 50 metáfases analisadas para cada tecido. Se houver suspeita de alteração cromossômica envolvendo uma translocação equilibrada detectável

em sangue periférico, que possa envolver células germinativas, a família deverá ser avaliada (18).

Salienta-se que a técnica de citogenética convencional pode introduzir tendências de seleção que distorcem a porcentagem de células com alteração (47,64,160). Tanto em citogenética clássica quanto para FISH, a cultura temporária de linfócitos estimulados pode ser influenciada por fatores que dificultem a identificação da alteração. A cultura resulta em uma mistura de células em que as alteradas estão pouco representadas na população total, podendo ser considerada artefato; somente as células T são analisadas e essas podem não ter a alteração; a resolução pode ser falha na identificação de pequenas alterações na citogenética e, no caso de FISH, a análise é específica e requer suspeita clínica (47,103). Assim, possivelmente alguns casos de mosaicismo não são diagnosticados devido ao fato da população celular utilizada para análise dificultar a identificação de mosaicos de baixa frequência (47,160).

No caso de cariótipo de fibroblastos o resultado pode ser influenciado por fatores como o tempo em cultura, drogas e nutrientes do meio de cultura e resistência a colchicina (103). Além disso, é difícil distinguir mosaicismo verdadeiro de pseudomosaicismo que frequentemente ocorre *in vitro* (32).

Para ambos os casos, também deve se considerar a seleção *in vitro* de células normais, ou seja, vantagem proliferativa (17,29,30).

1.8. Dados epidemiológicos

O MP tipo Ito é uma alteração relativamente comum, considerado o quarto transtorno neurocutâneo mais frequente, depois da Neurofibromatose tipo 1, Esclerose tuberosa e Síndrome de Sturge-Weber (80).

Apesar de estar associada a diversos quadros clínicos, a estimativa se baseia nos pacientes que procuram serviços de pediatria, dermatologia ou neurologia. Assim, nas publicações, a frequência pode estar subestimada em virtude da associação com anormalidades extracutâneas (13).

Ruiz-Maldonado et al (11) relataram uma frequência de 1 em 7.805 pacientes pediátricos. No estudo de Pascual-Castroviejo et al (9) foi relatada a frequência encontrada

em diferentes de especialidades clínicas na Espanha, sendo de 1: 600-700 pacientes avaliados em um serviço de neuropediatria; de 1:790 pacientes da dermatologia pediátrica; de 1:2983 pacientes pediátricos internados, de 1:63 pacientes pediátricos da dermatologia internados; de 1:8000 a 10000 da pediatria geral e de 1:1000 pacientes da neuropediatria. Ruggieri et al (14) relataram uma frequência de 1:82.000 na população geral.

Nas primeiras publicações foi relatada maior prevalência em mulheres e em não brancos. Estudos posteriores demonstraram igual proporção de homens e mulheres (26,85,152,158). As manchas encontradas em MP tipo Ito são mais evidentes em contraste com a pele escura e por isso são mais difíceis de descrever em caucasianos. Isso pode ter levado alguns autores a concluir maior incidência em não-brancos (9). Além disso, em alguns casos é difícil definir se há hipopigmentação ou hiperpigmentação, principalmente se as lesões forem grandes ou difusas (2,7,90).

1.9. Fatores genéticos: Herança e recorrência

Devido à associação com mutação pós-zigótica, na maioria das vezes é considerado um evento esporádico, *de novo* (2,3).

A idéia de que o MP do tipo Ito pode assumir herança autossômica dominante, recessiva, ou ligada ao X dominante tem sido discutida na literatura (161). Porém, não há um *locus* definido, há conflito de modo de transmissão e debates contra essa hipótese (96). Também sugeriu-se que a mutação seria letal quando inicialmente presente no zigoto sem a presença de clones normais, ou seja, só ocorre em estado de mosaico (2, 41).

Aproximadamente 10% dos pacientes relatam história familiar de convulsões ou epilepsia, casos em que se poderia considerar heterogeneidade clínica, em que as alterações pigmentares seriam somente um indicativo da base genética (87).

Alguns autores descreveram casos familiares e possível herança monogênica, mas tais evidências de uma base monogênica não foram confirmadas (2). Um desses exemplos é o relato de Vormittag et al. (158) em uma família na qual a mãe demonstrou hipopigmentação, anomalias nos olhos, convulsões e anomalias esqueléticas. Sua filha apresentava hipopigmentação seguindo as linhas de Blaschko e anormalidades nos olhos. Ritter, et al (1) salientaram que nos casos descritos a herança monogênica é improvável.

Assim como na maioria dos casos, considera-se que a descrição é insuficiente para associar a recorrência, o diagnóstico é incompleto e duvidoso para MP do tipo Ito, não há resultados citogenéticos ou os argumentos para o modo de herança não são convincentes (3,5,8,14,18,24,28,161-163).

Ruggieri, et al (161) comentaram criticamente o artigo publicado por Kuster e König (2) sobre os casos familiares salientando que, nos estudos em que foram publicados, nem todos os casos haviam sido considerados MP tipo Ito ou existe um diagnóstico duvidoso. Além disso, nenhum comprova a ocorrência familiar e o envolvimento epitelial, o que impossibilita sua classificação como herança monogênica, e alguns eram casos de IP (6,158).

A própria variedade de rearranjos cromossômicos encontrados, geralmente associado a mosaicismo, é um argumento contra a hipótese de doença monogênica (98).

A única explicação plausível para a recorrência seria a presença de anomalias cromossômicas em pais de crianças com MP tipo Ito ou um parente que demonstre anomalias cromossômicas ou mutação somática no sangue periférico, já que o conceito de mosaicismo está consolidado como fator da doença (14,90).

Horn et al (3) relataram o caso de dois meio irmãos com displasia pigmentar, um apresentando mosaicismo cromossômico em linfócitos e o outro com cariótipo normal. O mosaicismo cromossômico explicaria os sintomas e descartaria perda de heterozigose no primeiro caso, sendo excluído mosaicismo germinativo no pai, pois a linhagem celular com a anomalia estrutural teria origem pós zigótica. Assim, consideraram a aleatoriedade da recorrência, apesar da baixa probabilidade de mutações independentes aparecerem nos dois irmãos. O risco de recorrência, portanto, depende de muitas condições, mas estima-se ser baixo.

Pode-se concluir que a confusão no diagnóstico e no tipo de herança tem sido gerada por muitos fatores. Muitos casos tiveram diagnóstico incorreto, para outros tipos de depigmentação ou hipopigmentação seguindo as linhas de Blaschko para as condições de diferentes origens com fenótipo semelhante (14).

1.10. Diagnósticos diferenciais

Anomalias pigmentares na pele, particularmente aquelas extensas ou associadas a alterações multisistêmicas, frequentemente são um dilema diagnóstico (16). Entre as principais alterações pigmentares diferencia-se clinicamente:

1.10.1. *Hipermelanose com manchas difusas e lineares (LWH)*

Não é considerada uma entidade distinta, mas assim como o MP do tipo Ito, está inserida num grupo de alterações pigmentares heterogêneas e inespecíficas causadas por mosaicismo genético em que os achados diferem de acordo com a pigmentação da célula normal e alterada (22,29).

A ocorrência é esporádica, sem predileção por sexo, e foram descritas associação com anomalias congênitas em 31% dos pacientes, dado similar ao encontrado em MP do tipo Ito (4,12).

O termo foi criado por Kalter et al (164) para definir uma anomalia pigmentar esporádica que ocorre nos primeiros semanas de vida, caracterizada clinicamente por manchas e estrias de hiperpigmentação macular seguindo as linhas de Blaschko. Não é precedida por estágio inflamatório (bolhas ou verrugas) e histologicamente ocorre melanose epidérmica, aumento da pigmentação na camada basal e aumento de melanócitos sem incontinência pigmentar na derme, caracterizada por padrão de manchas inverso ao MP do tipo Ito (4,10,13,165) A maior dificuldade no diagnóstico está em determinar se há hipo ou hiperpigmentação anômala (10). Além disso, ambas são definidas distintamente por diferentes autores (13).

Alterações genéticas e cromossômicas associadas com anomalias pigmentares são heterogêneas, comparado com a multiplicidade encontrada em MP do tipo Ito, dados de citogenética em LWH são esparsos (165).

1.10.2. *Nevus depigmentoso*

Caracteriza-se por máculas acrômicas localizadas, não lineares, congênitas, que não sofrem alterações posteriores. Anomalias sistêmicas são raras (86,166).

1.10.3. *Nevus depigmentosus generalizado*

Hipopigmentação unilateral, congênita e estável (166).

1.10.4. *Incontinência pigmentar tipo Bloch-Sulzberger (IP)*

A confusão entre as condições resulta parcialmente do nome inicial do MP tipo Ito (*incontinentia pigmenti achromians*). As principais características que a diferencia de outras alterações cutâneas são o modo de herança, os efeitos clínicos e a história natural.

É uma doença dominante ligada a X, com *locus* em Xq28, letal em homens. Caracteriza-se por hiperpigmentação cutânea seguindo as linhas de Blaschko, frequentemente apresenta envolvimento sistêmico e ausência de fatores dismórficos em IP (5,10,167).

Diferencia-se clinicamente de outras anomalias pigmentares pois as lesões são precedidas por três estágios 1) dermatite linear com vesículas e eritema; 2) anomalias verrucosas lineares; 3) manchas hiperpigmentadas em listras e difusas de marrom para cinza (2,7,22) (figura7). Na minoria dos casos (13%) há um quarto estágio com hipopigmentação que pode ser confundido com MP tipo Ito (166).

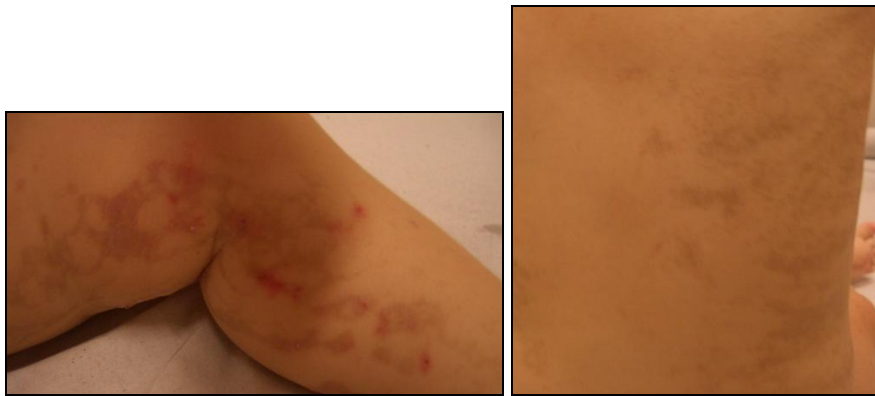


Figura 7. Aspecto das lesões cutâneas em paciente com incontinência pigmentar nos estágios 2 e 3, respectivamente. Fonte: Arquivo DGM/FCM/Unicamp

1.10.5. *Esclerose tuberosa*

Apresenta máculas hipomelanóticas como manifestação inicial. As lesões são múltiplas, com bordas irregulares (2).

1.10.6. Nevo Epidérmico e síndrome do Nevo epidérmico

Apresenta diferentes tipos de lesões, se sistêmico denomina-se síndrome de Nevo Epidérmico e associa-se a anomalias esqueléticas e neurológicas (10).

1.10.7. Hipomelanose filóide

Síndrome neurocutânea rara caracterizada por um padrão de hipopigmentação em formas brotos de folha ou máculas em retângulos que lembram ornamentos florais. Geralmente associada a anomalias extracutâneas como cerebrais, oculares e esqueléticas. Considera-se que sua origem se deva a trissomia em mosaico parcial ou total do cromossomo 13q (168,169). Apesar da semelhança, considera-se uma entidade clínica geneticamente diferente do MP do tipo Ito. Há pelo menos dois casos publicados em que houve confusão no diagnóstico (170,171).

1.10.8. Cutis tricolor

Sugere-se o termo quando há presença de três colorações na pele: pele normal, hipo e hiperpigmentada. Provavelmente representa mosaicismo com três linhagens celulares geneticamente diferentes (14,42,172). Alguns autores consideraram esse quadro como MP do tipo Ito (30, 42).

1.11. Prognóstico

O prognóstico varia com a porcentagem de células afetadas pela anomalia em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o cérebro. No estudo de Hansen et al (65) foi encontrado mosaicismo de 10% de células anormais em amostra de pele, assumindo que a mesma proporção ocorreria no SNC e explicaria os achados neurológicos relativamente leves. Um mau prognóstico é notado em pacientes com convulsões refratárias (76).

O diagnóstico específico é necessário para o conhecimento dos pais, prognóstico e aconselhamento genético (69). Porém, todas as crianças com lesões cutâneas, principalmente se associada a convulsões e sem etiologia definida, devem ser avaliadas e acompanhadas com avaliações oftalmológicas, neurológica, cardiológica, além do seguimento do desenvolvimento mental e motor (80). O diagnóstico prematuro é essencial para se iniciar intervenções terapêuticas e melhorar o desenvolvimento do paciente, especialmente minimizar a agressividade associada a dificuldades de comunicação (62, 67).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O MP tipo Ito é um distúrbio pigmentar frequente, no qual é comum a associação com alterações neurológicas, o que torna essa situação importante do ponto de vista clínico. Diante da heterogeneidade clínica e genética do MP tipo Ito, faz-se necessário estudo desses indivíduos com o objetivo de delinear melhor a etiologia da alteração cutânea inserida em diferentes quadros clínicos.

O estudo citogenético pode contribuir na identificação de regiões cromossômicas ou genes importantes na patogênese da doença, tanto para definição de regiões cromossômicas que possam estar envolvidas, quanto para associação do estado de mosaicismo em diferentes tecidos com o quadro clínico. Esses fatores podem incluir regiões associadas às bases genéticas da pigmentação cutânea e ao desenvolvimento dos diversos órgãos, sobretudo regiões críticas ao desenvolvimento neurológico em casos associados a RM e epilepsia.

A identificação dessas regiões em células de mesma origem embrionária pode se relacionar com o prognóstico neurológico e refletir a disrupção de genes da pigmentação e, logo, as alterações pigmentares em MP tipo Ito.

O diagnóstico claro, sobretudo em pacientes com anomalias congênitas múltiplas, pode fornecer benefício psicológico às famílias, pois estabelece uma causa. Além disso, promove melhor avaliação do possível risco de recorrência, importante para o processo do aconselhamento genético.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo identificar alterações citogenéticas em indivíduos com MP tipo Ito.

3.2. Objetivos específicos

- Realização de estudo citogenético convencional em linfócitos do sangue periférico e em fibroblastos da pele, com contagem de metáfases para pesquisa de mosaicismo, em indivíduos portadores de MP tipo Ito
- Padronização de técnica para obtenção de cariótipo de queratinócitos e melanócitos nesses indivíduos.
- Comparação do padrão citogenético das regiões hipopigmentada e normal da pele.
- Utilização de diferentes técnicas de citogenética para complementação dos resultados encontrados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCM/Unicamp) em 08/11/07 sob parecer nº 751/2007 (anexo 1). A coleta de dados e de espécimes biológicos para estudos foi realizada após obtenção de consentimento informado aos responsáveis pelos indivíduos de pesquisa. Os dados gerais dos indivíduos que compuseram a casuística são fornecidos na tabela II e detalhados no Anexo 2.

Tabela II. Resumo dos dados clínicos dos indivíduos incluídos no estudo.

Alterações fenotípicas/ Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RDNPM		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Dificuldade na fala								X		X		X			
Cardiopatias	X									X		X	X		
Convulsões		X				X	X		X						X
Assimetria	X				X	X						X			
Escoliose		X				X									
Dismorfismos faciais	X			X	X	X	X		X			X	X	X	
Malformação de dedos	X					X		X	X				X		
Malformação cerebral			X		X				X		X			X	
Alterações oculares				X	X	X			X						
Alteração muscular					X	X							X		
Alterações ósseas							X		X			X			
Hirsutismo										X		X			
Autismo															X

Os indivíduos com MP tipo Ito foram provenientes dos ambulatórios de Genética e de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, sendo avaliados por um mesmo geneticista clínico.

As culturas de fibroblastos, melanócitos e queratinócitos foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células da Pele/CIPED/FCM, Unicamp, conforme protocolo padronizado (173).

A preparação citogenética de linfócitos e células de pele, bem como a análise do cariótipo e de FISH do material foram realizados no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM, Unicamp.

A técnica de *array*-CGH foi realizada no Laboratório da Dra. Carla Rosenberg, no Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de São Paulo - IB/USP, São Paulo, SP.

4.1. Cultura e padronização da preparação cromossômica a partir de células epiteliais

4.1.1. Amostra inicial

Para a padronização da técnica citogenética em células epiteliais foram utilizadas amostras residuais de procedimento cirúrgico (dermolipectomia e postectomia), fornecidas pelas equipes de cirurgia plástica e pediatria do Hospital das Clínicas da Unicamp, após autorização e assinatura do termo de consentimento específico pelo paciente submetido ao procedimento ou pelo responsável.

O material foi coletado pela equipe cirúrgica em frascos estéreis contendo solução salina 0,9% com adição de antibiótico e antifúngico (penicilina sódica, estreptomicina e anfotericina B), na concentração 1:100/mL.

4.1.2. Cultivo de células da pele

Em fluxo laminar, cada amostra de pele foi lavada com solução contendo antibiótico por várias vezes, para diminuir riscos de contaminação da cultura e para retirar excesso de sangue. As amostras foram separadas em derme e epiderme com auxílio de instrumental cirúrgico estéril e em seguida, repicada em pequenos fragmentos com tesoura cirúrgica.

Após a adição de tripsina/EDTA 0,25%, as amostras foram incubadas a 37° C por até 4 horas, dependendo do tamanho dos fragmentos iniciais, para dissociação das células. Posteriormente, a tripsina foi neutralizada com meio MCDB135 com 20% de soro fetal bovino. Com o auxílio de pipeta misturou-se vigorosamente a solução para auxiliar na liberação das células e, em seguida, o material foi filtrado com filtro de nylon 40 µm para separação celular.

O fragmento correspondente à derme e o material residual da filtração das células após a fragmentação enzimática foram utilizados para iniciar a cultura de fibroblastos a partir de técnica de explante ou suspensão celular (item 4.2).

A suspensão celular obtida da filtração foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm, as células precipitadas foram lavadas com HBSS, antibiótico e antifúngico e novamente centrifugadas. O *pellet* foi ressuspensionado no meio de cultura escolhido e uma alíquota foi separada e utilizada para contagem e avaliação em câmara de Neubauer por método de *Trypan Blue*. A suspensão celular foi distribuída nos frascos de cultura numa concentração inicial de 1×10^5 células/cm² por frasco. Dependendo da quantidade de células obtidas, iniciou-se a cultura em frasco de 25cm³ ou em placas de seis *wells*. Os frascos foram incubados a 37° C, com tensão de 5% CO₂. (173).

O meio utilizado para queratinócitos foi o *keratinocyte-SFM* (Gibco 17005-042), suplementado com L-glutamina 2 mM/mL, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 0,1 mg/mL (Gibco cat n. 10378-016). Após o estabelecimento da cultura, livre de fibroblastos, foi adicionado 10% SFB.

Para obtenção dos melanócitos e, eventualmente, fibroblastos utilizou-se o meio MCDB 153 (Sigma cat n.M7403) suplementado com L-glutamina 2 mM/mL, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL (Gibco cat n. 10378-016), soro fetal bovino 10%, 30 µg/mL de insulina (Gibco cat n. 13007-018), 62,5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma cat n. H-0888) e 0,63 µg/mL de extrato de pituitária bovina (Gibco cat n. 13028-014) (173). Para algumas culturas de melanócitos também foi testado o meio para melanócitos basal Cascade 254 (Gibco cat n. M-254-500).

Inicialmente dividiu-se a suspensão celular em dois frascos, sendo um ressuspensionado em meio específico para queratinócitos e outro em meio para melanócitos. Porém, percebeu-se que as culturas iniciadas com meio de queratinócitos apresentaram crescimento mais acentuado de ambos os tipos celulares. Dessa forma, as culturas passaram a ser iniciadas em meio *keratinocyte-SFM* e, após alguns dias, nos frascos que apresentam mais melanócitos foi realizada a adaptação e troca de meio para o MCDB153 suplementado.

Devido à necessidade de SFB para o estabelecimento da cultura de melanócitos, frequentemente foi verificada contaminação da cultura com fibroblastos, tornando seu uso inviável para a proposta do trabalho, uma vez que se pretende analisar culturas de células específicas. Iniciando as culturas de queratinócitos sem o uso de SFB, foram obtidas culturas puras desse tipo celular.

Os queratinócitos foram naturalmente eliminados das culturas de melanócitos pois a formulação dos meios utilizados não continha fator de crescimento de epiderme, essencial à sua proliferação.

A partir de levantamentos da literatura, foram realizados alguns testes para separação dos tipos celulares através de tripsinização progressiva (174). A eliminação de melanócitos presentes nas culturas de queratinócitos foi, então, padronizada a partir da diferença de aderência e tempo de liberação do suporte de adesão, com o uso de EDTA por cerca de 45 minutos.

Esse método, porém, não se mostrou satisfatório para eliminação de fibroblastos. Foi, então, padronizado o uso de geneticina (Gibco cat n. 11811-023) na concentração de 100 µg/mL de meio, por até uma semana, para eliminação de fibroblastos sem que houvesse sofrimento de queratinócitos e melanócitos (175).

Os meios de cultura foram trocados duas a três vezes na semana, dependendo da confluência verificada no frasco. Quando as culturas apresentaram confluência de cerca de 80% passavam a ser repicadas, dando origem às subculturas.

Para a repicagem das células retirou-se o meio de cultura e adicionou-se Tripsina/EDTA 0,25% a 37° C, mantendo por cinco minutos para remoção das células. A tripsina foi neutralizada com meio MCDB153 com 10% de SFB e a suspensão celular foi transferida para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 10 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura específico, em volume suficiente para distribuição em frascos de acordo com a concentração celular, retornando-se os novos frascos à incubação por 37°C com CO₂ a 5%.

No caso de melanócitos, a proliferação se concentrou em alguns pontos do frasco. Mesmo com baixa confluência, quando esses pontos isolados atingiram concentração celular foi feita a repicagem para evitar inibição por contato.

4.1.3. Padronização da técnica citogenética

De acordo com o objetivo do trabalho, procurou-se fazer a retirada das células para a preparação cromossômica quando a cultura estava em fase *log*, período em que há maior proliferação celular e, conseqüentemente, maior número de metáfases. A observação diária em microscópio invertido auxiliou na identificação desses períodos. Cerca de 30 dias após

o início da cultura, 24 h após troca do meio, as culturas com 75% de confluência foram coletadas para a preparação cromossômica.

Para a padronização do método e escolha do melhor período de obtenção de metáfases, retiraram-se culturas em diferentes estágios de confluência, diferentes tempos de cultura e número de passagens.

O protocolo utilizado para a preparação cromossômica de melanócitos e queratinócitos foi baseado em técnica de fibroblastos já utilizada no Laboratório de Citogenética Humana do DGM/FCM, com algumas modificações para esses tipos celulares baseadas na literatura (176).

De acordo com os resultados obtidos, testaram-se protocolos com as seguintes variáveis:

- Tempo de cultura e número de passagens;
- Tempo de exposição e concentração do agente anti-mitótico:
ColcemidTM (10 µg/mL) (invitrogen cat 15210040):
Tempo: 4 a 16 h;
Concentração de 0,16 a 0,6 µg/mL;
- Colchicina (16 µg/mL) (Sigma): Tempo: 1 a 3 h;
Concentração de 0,55 µg/mL;
- Hipotonia: tempo, volume e solução hipotônica (Cloreto de potássio 0,075 M e Citrato de Sódio 0,8).

Também foi testada a adição 5'bromodesoxiuridina (5-BrdU) ou Brometo de etídeo algumas horas antes do término da cultura, para melhorar a resolução dos cromossomos para análise.

4.1.4. *Queratinócitos*

Quando em condições satisfatórias, as culturas foram incubadas com o agente antimitótico. De acordo com os protocolos testados, padronizou-se o protocolo com melhor resultado.

Foram utilizadas culturas de até três passagens. Adicionaram-se 50 µL de ColcemidTM (10 µg/mL) (Invitrogen cat 15210040), incubando por 5 h a 37° C. Algumas

culturas, que apresentavam crescimento mais lento, tiveram melhor resposta com a adição de 20 µL de Colcemid por 16 horas.

Após o período estabelecido fez-se a liberação das células do suporte de adesão com tripsina-EDTA 0,25% a 37°C. A solução foi neutralizada com meio MCDB153 com 20 % de SFB, centrifugou-se a 1500 rpm por sete minutos e o material sedimentado (cerca de 1 mL) foi submetido à hipotonia.

Fez-se a hipotonia adicionando-se 5 mL de cloreto de potássio 0,075M a 37°C, e incubando por 15 minutos após agitação em vórtex. Interrompeu-se a hipotonia com 1 mL de fixador (metanol:ácido acético glacial, 3:1) e centrifugou-se a 1500 rpm por 7 min.

Descartou-se o sobrenadante mantendo-se 1 mL de residual, ao qual se adicionou 4 mL de fixador e agitou-se no vórtex. Centrifugou-se e repetiu-se esse procedimento por três vezes.

O material foi ressuspensionado em 1 mL da solução para a confecção das lâminas. As lâminas foram mantidas a 57°C durante a noite. Utilizou-se bandamento G com tripsina 0,05% por 5 a 10 segundos e coloração com corante *Wright* (0,25 % m/v) e tampão fosfato, solução 1:3 por 5 min. (177).

4.1.5. *Melanócitos*

De acordo com os resultados que se apresentavam, foram feitas alterações tanto no meio de cultura utilizado quanto na obtenção da cultura primária, conforme mencionado, na tentativa de conseguir culturas mais confluentes e adequadas à proposta. Esse tipo celular, porém, apresentou baixa taxa de proliferação e, conseqüentemente, a obtenção de metáfases foi dificultada.

Foram testados diversos protocolos, seguindo o mesmo padrão de variáveis utilizado para queratinócitos. Como essas células se mostraram mais resistentes à hipotonia, também foi realizada hipotonia direta de forma a testar o tempo necessário para esse tipo celular. Através desse método foi possível avaliar, por observação em microscopia de inversão, o tempo necessário e a melhor solução para hipotonia de melanócitos (178)

Foi constatado melhor resultado com solução de citrato de sódio 0,8% e KCl 0,075 M, em igual volume, a 37°C por 40 min. A partir desse resultado foram testados protocolos de preparação direta ou *in situ*. Esse método, em geral, é utilizado para diagnóstico pré

natal, em que se trabalha com uma quantidade limitada de células (178). Para esse procedimento, após a repicagem da cultura estabelecida, a suspensão celular foi depositada diretamente sobre lamínula estéril em placas de petri. Após a adesão das células, foi completado o volume de meio de cultura necessário para a placa. As culturas foram mantidas até começar a se proliferar e apresentar sinais de divisão celular acentuada, quando então foram incubadas com o agente antimitótico por pelo menos 6 h.

Iniciou-se a adequação dessa técnica para esse tipo celular de forma a melhorar a qualidade e resolução do material a partir do uso de 5-BrdU associado ao colcemid.

4.2. Cultura e preparação cromossômica a partir de fibroblastos

No momento de estabelecer a cultura primária dos indivíduos da pesquisa, foi iniciada cultura de fibroblastos de duas formas diferentes. Conforme descrito acima, foi utilizado (1) o material da derme separada da amostra, para estabelecer a cultura por explante e (2) o residual da filtração das células epiteliais, para iniciar cultura de suspensão celular. Foi estabelecido esse critério como forma de otimizar as culturas e obter a maior quantidade de células possível.

Fragmentos de cerca de 1 a 2 mm retirados da derme foram depositados diretamente sobre o suporte de adesão no frasco de cultura de 25 cm³. Em cada frasco iniciou-se a cultura com três a seis fragmentos. Para efetivar a aderência foram colocados cerca de 10 µL de SFB dividido entre os fragmentos. Além disso, também foram adicionados 50 µL de meio de cultura como forma de manter o ambiente úmido. Os frascos foram incubados a 37°C fechados e, após dois ou três dias, os fragmentos estavam aderidos, sendo adicionado meio de cultura (3 mL). Após o estabelecimento da cultura, os fragmentos foram retirados e deu-se continuidade ao cultivo. Se necessário, os explantes foram transferidos para outro frasco para iniciar nova colônia.

O material residual encontrado nos filtros foi retirado e ressuspensionado diretamente em 3 mL de meio de cultura e colocado em frasco de cultura.

Essas células foram cultivadas em MCDB153 (sigma cat n.M7403) suplementado com 20% de SFB, estreptomicina, penicilina e glutamina (Gibco cat n. 10378-016). Em culturas com baixa resposta ao cultivo, o meio foi suplementado como o utilizado para melanócitos.

Assim como as linhagens já descritas, as culturas foram mantidas a 37°C com 5% CO₂. A troca de meio de cultura foi realizada duas a três vezes na semana e a repicagem realizada quando necessário.

Os fibroblastos foram cultivados por cerca de duas a três semanas, com duas a três passagens. Quando confluyente, no dia posterior à troca de meio, foi adicionado colcemid 0,5 µg/mL (10 mg/mL) e o material foi incubado por 5 h. Um frasco foi mantido como estoque.

Após esse período adicionou-se 2,5 mL de tripsina/EDTA para o desprendimento das células. A tripsina foi inativada com a adição de 5 mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino e as células foram transferidas para um tubo cônico.

O material foi centrifugado a 1200 rpm por sete minutos e o sobrenadante foi descartado, mantendo 1 mL residual. A hipotonia foi feita com 4 mL de KCl 0,075 M a 37°C por 12 min.

Interrompeu-se a hipotonia com a adição de 0,5 mL de fixador (metanol:ácido acético glacial, 3:1) e centrifugou-se a 1500 rpm por 7 min.

Descartou-se o sobrenadante mantendo-se 1 mL de residual, ao qual se adicionou 4 mL de fixador e agitou-se no vórtex. Centrifugou-se e repetiu-se esse procedimento por três vezes.

O material foi ressuspendido em 1 mL da solução para a confecção das lâminas. As lâminas foram mantidas a 57°C *over night*. Utilizou-se bandamento G com tripsina 0,05% por 5 a 10 segundos e coloração com corante *Wright* (0,25% m/v) e tampão fosfato, solução 1:3 por 5 min (97).

4.3. Cariótipo de linfócitos

Em cada paciente foi realizado, inicialmente, análise citogenética de linfócitos. A cultura foi realizada segundo a técnica descrita por Moorhead et al (179), conforme modificações e padronização do Laboratório de Citogenética do DGM/FCM/Unicamp.

A amostra foi coletada em seringa com 0,1 mL de heparina. Foi realizada cultura de 72 horas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 15% de SFB e 0,1 mL de fito-hemaglutinina, em triplicata. Após esse período adicionou-se colchicina e incubou-se novamente a 37°C por duas horas.

A hipotonia foi feita de forma progressiva, com volume final de 5 mL de KCl 0,075 M pH 6,8 por a 37°C. A hipotonia foi interrompida com 1 mL de solução fixadora (metanol:ácido acético 3:1), seguida da fixação com a mesma solução por três vezes. Mantinha-se em freezer até o dia seguinte, quando era feita mais uma lavagem antes do preparo das lâminas.

As lâminas foram mantidas a 57°C *over night*. Para obtenção das bandas G, as lâminas foram incubadas por período variável de 20 a 60 min em tampão fosfato 0,06 M pH 6,8 ou em tripsina 0,5% por 5 a 10 segundos. Utilizou-se corante Wright (0,25 % m/v) e tampão fosfato, solução 1:3 por 5 min (16).

4.4. Seleção e amostra dos pacientes

A casuística foi composta 15 indivíduos que apresentam MP tipo Ito, de ambos os gêneros e idades variadas, atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp. Todos os indivíduos foram avaliados por um mesmo examinador (anexo 3).

Para o estudo citogenético de linfócitos foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue venoso periférico. Em todos os pacientes foi realizado cariótipo de linfócitos com pesquisa de mosaicismo (50 a 100 metáfases).

Para a cultura de células da pele foi realizado biópsia de pele com o auxílio de *punch* estéril (5 mm de diâmetro), sob anestesia local. Foram coletadas amostras da região hipopigmentada e da região de pigmentação normal, variando o local de coleta de acordo com a região corporal na qual cada paciente apresentava as lesões.

Para fibroblastos, foram analisadas 50 a 100 metáfases de cada região da pele (hipo e normopigmentada). Alterações encontradas em fibroblastos foram confirmadas com uma segunda retirada de outro frascos de cultura independente.

4.5. Estudos complementares

Para complementação do resultado de alguns casos foram realizadas técnicas adicionais, descritas abaixo.

4.5.1. Teste de inativação do cromossomo X por replicação tardia

A amostra de sangue periférico foi coletada em seringa com 0,1 mL de liquemine. A cultura de linfócitos foi iniciada conforme descrito acima. Cerca de 8 horas antes do término da cultura foi adicionado 200 µg/mL de meio de 5-BrdU (178,182). Após 7 h adicionou-se colchicina (1,6 µg) e incubou-se novamente a 37°C por uma hora.

Fez-se a retirada, hipotonia e fixação conforme já descrito, porém nesse experimento a amostra foi sensível à luz. Após a confecção das lâminas, fez-se a coloração com laranja de acridina (0,1 mg/mL, em tampão *Sorensen* 0,06 M pH 6,5). Corou-se a lâmina imersa na solução por 5 minutos e, em seguida, lavou-se com tampão. As lâminas foram montadas com lamínula com o uso de tampão e analisadas em luz UV (420 a 460 nm).

4.5.2. Hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Essa técnica baseia-se na hibridação de sondas de DNA específicas a sequências de DNA alvo, possibilitando a identificação de segmentos cromossômicos pela homologia e hibridação entre essas sequências.

Foram utilizadas sondas alfa-satélite DXZ1 e D18Z1 (Cytocell), que hibridizam respectivamente nas regiões centroméricas dos cromossomos X e 18, e a sonda MD DiGeorge "TUPLE I" (22q11)/(22q13) (SHANK3) (Kreatech-Poseidon), que hibridiza na região 22q11, região deletada em casos de Síndrome velocardiofacial, mas tem como controle interno a região terminal do cromossomo 22, em 22q13. Foram analisadas 20 a 50 metáfases e/ou 100 a 500 núcleos.

As amostras utilizadas para FISH metafésico foram cultivadas e seguiram a mesma preparação citogenética descrita. Para as reações de FISH por preparação direta foram realizados os mesmos procedimentos de hipotonia e fixação diretamente no material coletado. Para material de mucosa oral foi coletado esfregaço dessa região, em SF 0,9%, com o auxílio de uma espátula. Esse material foi lavado por três vezes em solução salina e, após, foi fixado em metanol-ácido acético e disposto em lâminas.

Para as reações de FISH foi utilizado o protocolo de co-denaturação, conforme instruções do fabricante. Às lâminas contendo material fixado de linfócitos foi adicionada a sonda de FISH, a área foi coberta com lamínula e selada. A lâmina foi submetida a 75°C

(+/- 1°C) por 5 a 10 minutos para desnaturação das fitas de DNA da amostra e sonda. A hibridação ocorreu a 37°C (+/- 1°C) de 12 a 16 horas em câmara úmida. Após esse período foi realizada lavagem pós-hibridação, e adicionado 15 µL do contracorante Dapi II sobre a área de hibridação. A lâmina foi montada com lamínula e, após pelo menos 10 minutos, analisada em microscópio de fluorescência.

4.5.3. Array-CGH

O estudo foi feito em colaboração com o laboratório da Dra. Carla Rosenberg, no Departamento de Genética e Evolução do IB/USP.

Utilizou-se uma lâmina de oligonucleotídeos de alta resolução contendo 180 mil clones espalhados por todo genoma (CytoChip Oligo ISCA 4x180K - BlueGnome).

As amostras teste e referência foram marcadas por *random priming* com Cy3- e Cy5 dCTPs e em *Dye-swap*. A purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizadas de acordo com os protocolos descritos pelo fabricante.

Para a coleta dos dados foi utilizado o scanner da Agilent e o software *Agilent Feature Extraction* (ambos da Agilent Technologies). Para analisar os dados obtidos utilizou-se o software *Agilent Genomic Workbench Standard Edition 5.0* CGH, com o qual se obtiveram as intensidades das fluorescências e os dados estatísticos ($\log_2$ ratio), bem como um display gráfico dos resultados. Apenas as alterações que continham no mínimo

três oligonucleotídeos consecutivos com razão $\log_2$ alterada seriam consideradas pelo programa como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultura e padronização da preparação cromossômica a partir de células epiteliais

O tempo de cultivo variou com o tipo de material utilizado para obtenção das células, sendo que o uso de prepúcio mostrou-se mais efetivo.

A cultura inicial, chamada cultura primária, apresenta um misto de células representativas do tecido epitelial e apresenta baixa taxa de proliferação (figura 8).

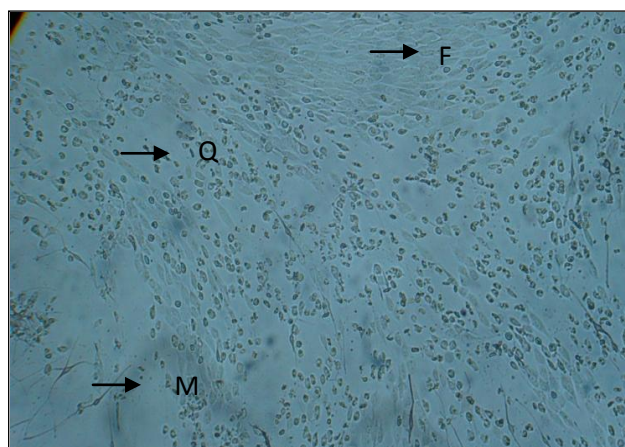


Figura 8: Cultura inicial mista, com presença de melanócitos (M), queratinócitos (Q) e fibroblastos (F). Microscópio de inversão A: 20X

Quando a cultura se estabeleceu e atingiu confluência no suporte de adesão fez-se a repicagem. Esse processo auxilia na expansão da cultura e obtenção da linhagem celular. Com o uso de meios de cultura específicos foi possível a obtenção de culturas homogêneas a partir da terceira passagem, devido à melhor adaptação ao meio (figura 9).

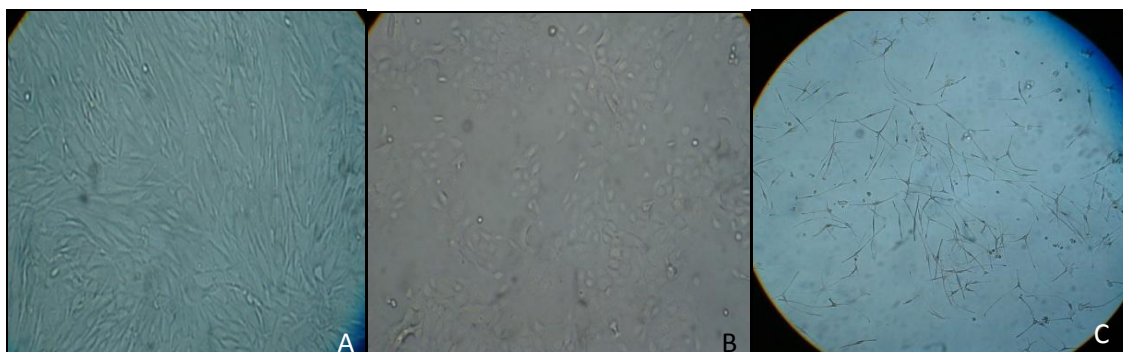


Figura 9: Culturas puras fotografadas em microscópio de inversão A: 20X. A – Fibroblastos; B – Queratinócitos; C – Melanócitos.

5.1.1. Queratinócitos

Em amostras teste, as culturas de queratinócitos foram estabelecidas com sucesso, possibilitando a obtenção de linhagem homogênea em até um mês em cultivo. O uso de meio livre de SFB facilitou a eliminação de fibroblastos.

No decorrer dos experimentos, após a padronização do procedimento, foram realizados testes paralelos para verificar o surgimento de alterações cromossômicas *in vitro* em diferentes tempos de cultura e número de passagens. As culturas confluentes com até três passagens foram as que possibilitaram melhores resultados.

A adição de 50 μ L de ColcemidTM (10 μ g/mL) por 5 horas a 37°C apresentou bons resultados. Algumas culturas que apresentavam crescimento mais lento tiveram melhor resposta com a adição de 20 μ L de Colcemid por 16 horas. Também foi testado a adição 5-BrdU ou Brometo de etídeo algumas horas antes do término da cultura, melhorando a resolução dos cromossomos para análise.

Esse protocolo possibilitou a obtenção de metáfases em número e qualidade suficientes para a análise do cariótipo em amostras teste (figura 10).

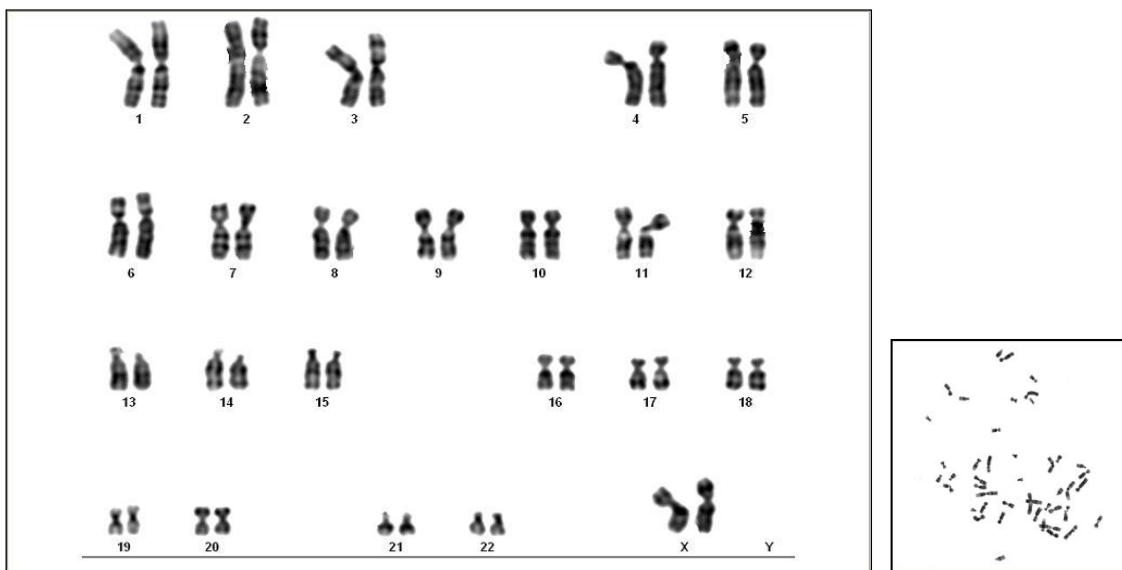


Figura 10: Imagem de metáfase e cariótipo obtido a partir de queratinócitos de cultura teste.

Em culturas com mais de três passagens não se obteve sucesso na obtenção de metáfases, o que poderia indicar que os queratinócitos não estavam em fase de divisão celular ativa. Estudos prévios realizados no Laboratório de Cultura de Células da Pele

demonstraram que estas células, a partir do quarto subcultivo consecutivo, apresentaram redução no processo de divisão celular e iniciaram processo de apoptose (dados não publicados, comunicação pessoal).

A partir de cinco materiais diferentes, foram realizadas 18 retiradas de queratinócitos para cariótipo. Foi obtido sucesso em 13 retiradas, com possibilidade de análise de mais de 50 metáfases. Nenhuma apresentou alteração *in vitro*.

Após a padronização, foram iniciadas algumas culturas com material de paciente, mantidos os mesmos protocolos e critérios. Não houve crescimento celular de queratinócitos satisfatório para análise citogenética. Mesmo em meio específico para queratinócitos, algumas culturas desviaram para o desenvolvimento de melanócitos. Não se conseguiu uma explicação para esse fato, exceto pelos dados de Vergine *et al* (105) que, através de estudos histológicos de indivíduos com MP tipo Ito, encontraram diminuição do número de queratinócitos. Esse dado, porém, não explicaria o não crescimento de culturas obtidas de pele normal. Nesse mesmo sentido, poderia se fazer uma associação com o estudo conduzido por Bondanza *et al* (190) com pacientes portadores de vitiligo, houve baixo potencial de proliferação de queratinócitos derivados do tecido envolvido, em comparação com a pele não envolvida a partir da segunda subcultura, não sendo tal fenômeno explicado em pormenores pelos autores.

Defeitos em receptores de fatores de crescimento presentes no meio de cultura também podem determinar baixo crescimento celular (191). Considerando que vários fatores podem estar envolvidos no processo de pigmentação (22), pode-se considerar que defeitos em receptores específicos possam determinar o quadro clínico e, conseqüentemente, se supor que as células envolvidas podem ser portadoras de defeitos genéticos que determinem baixo crescimento *in vitro*.

Apesar de se considerar que melanócitos e queratinócitos poderiam ser as melhores alternativas para avaliar mosaicismo em MP, uma vez que estão diretamente relacionados com a produção e distribuição de melanina, tais células não se mostraram adequados para esses estudos, visto serem tecnicamente muito difíceis de crescer em cultura (13).

Outros estudos desenvolvidos no Laboratório de cultivo de células da pele/Cipeda/Unicamp que trabalham com culturas mistas de células epiteliais demonstram melhor proliferação celular, provavelmente devido a interação intercelular e liberação de

fatores de crescimento. No caso desse estudo, devido à proposta de estudar alterações cromossômicas possivelmente específicas a cada tipo celular, se fez necessário o estabelecimento de culturas 100% puras (homogêneas). As culturas nessas condições se mostraram com proliferação mais lenta, dificultando a obtenção de um número razoável de células.

No estudo de Taibjee et al (29) foram analisados queratinócitos de oito pacientes com MP tipo Ito, com o intuito de verificar a relação entre a alteração citogenética e a região da pele envolvida ou não pela hipopigmentação. Os resultados mostraram relação em apenas um caso, a saber, com cariótipo 47,XX,+20[9]/46,XX[14] em queratinócitos derivados da região com hipopigmentação. Em suas conclusões, tais autores comentaram que além de o resultado não ter sido muito eficiente na detecção de alterações cromossômicas nesses pacientes, a análise citogenética de células epidérmicas, em particular de queratinócitos, não seria possível rotineiramente.

5.1.2. *Melanócitos*

Quando suspeita-se de aberração cromossômica e o estudo citogenético em linfócitos, fibroblastos e queratinócitos for normal, resta a possibilidade de que uma eventual alteração cromossômica possa estar restrita aos melanócitos. Estudos com esse tipo celular, porém, ainda não foram estabelecidos devido às dificuldades de seu cultivo. (2,148).

Melanócitos humanos normais são difíceis de isolar e propagar *in vitro* pois representam somente 2-5 % das células epidérmicas e seu crescimento em cultura é muito lento, o que dificulta a cultura e a obtenção de metáfases para análise citogenética. De acordo com a literatura, se obtém sucesso na cultura de melanócitos em 80% dos casos com pele de recém nascidos e em 10% dos casos em epiderme adulta (81,191,192).

No presente estudo, foram obtidos avanços nas culturas de células puras, porém os testes realizados com as variáveis descritas não resultaram em sucesso na obtenção de metáfases para este tipo celular. Devido à baixa proliferação dessas células, os estudos sugerem o uso de pelo menos dois agentes mitogênicos diferentes nas culturas de melanócitos (174), entretanto alguns fatores de crescimento podem transformá-las em

melanoma maligno ou ter ação clastogênica. (191). Por isso, limitou-se o uso de fatores mitogênicos que não induzissem a ocorrência de alterações cromossômicas.

Nas culturas realizadas, células em estágio inicial de proliferação apresentaram uma maior taxa de divisão celular, porém confluência insuficiente. A obtenção de culturas com maior confluência celular requer tempo prolongado, levando ao estágio de senescência e baixa taxa de proliferação celular (193,194).

Considerando-se que não há relatos específicos com relação ao período de tempo do ciclo celular para essas células, o tempo necessário para obtenção de culturas confluentes pode ser um fator importante na obtenção de metáfases, bem como o tempo necessário de exposição ao colcemid. Devido a isso, foram realizados diferentes testes com tempo de exposição ao agente. Porém, essa variável não mostrou diferença nos resultados.

Diante disso, foram realizados testes com cultivo *in situ* seguido de hipotonia e fixação direta. Através desse método foi possível avaliar melhor o tempo necessário para hipotonia de melanócitos por observação em microscopia de inversão. Essas células pareceram ser mais resistentes à solução hipotônica, sendo realizada hipotonia com uma solução de citrato de sódio 0,8% e KCl 0,075 M, em igual volume, a 37°C por 40 min. Através dessa técnica, com a adição de colcemid por seis horas, foi possível a obtenção de metáfases, porém com qualidade inadequada para análise (figura 11).

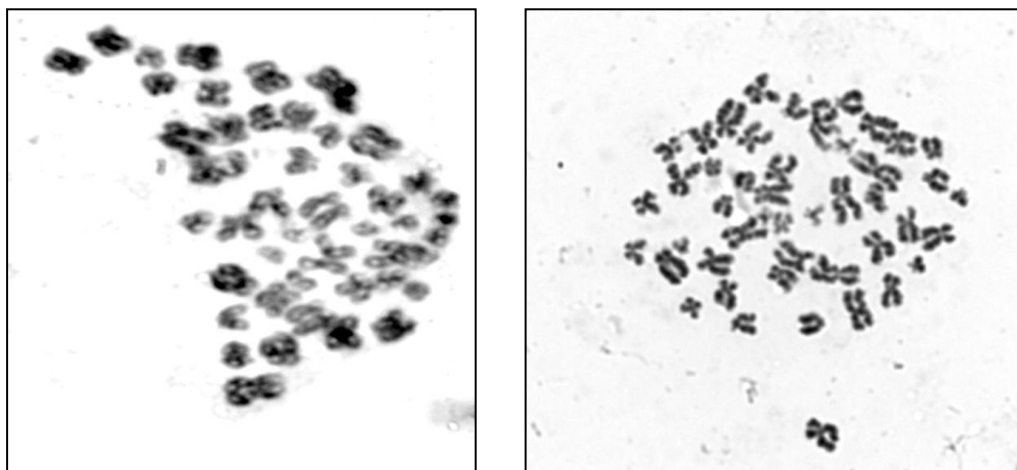


Figura 11: metáfases obtidas a partir de culturas de melanócitos, preparação *in situ*

Procedeu-se a outras adequações dessa técnica para esse tipo celular, aumentando o número de lâminas por indivíduo e realizando hipotonia controlada por observação em microscopia invertida. Além disso, passou-se a adicionar 5-BrdU algumas horas antes da retirada. Apesar da melhora na qualidade, novamente foram obtidas poucas metáfases por lâmina, havendo um máximo de cinco por área de 24x32 mm (figura 12).

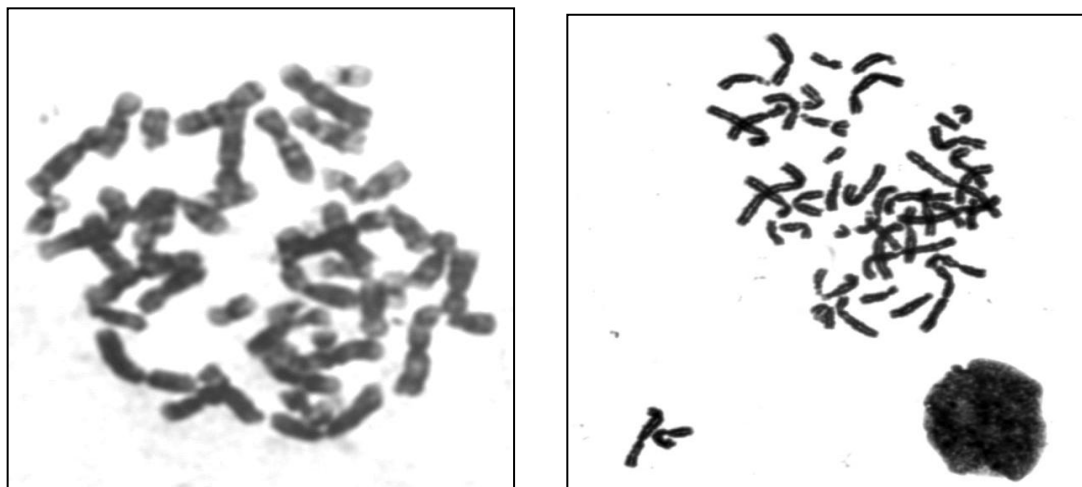


Figura 12: Metáfases obtidas a partir de preparação in situ de melanócitos com adição de 5-BrdU

Assim, não foi possível estabelecer o cariótipo nas amostras de melanócitos dentro do tempo disponível para a realização dos experimentos deste estudo.

Em virtude do insucesso na obtenção de metáfases adequadas para análise citogenética, as amostras de pacientes que se direcionaram para cultura de melanócitos e obtiveram confluência de 70% foram criopreservadas. Esse material poderá ser utilizado para identificação de possíveis aneuploidias em melanócitos com o uso de lâminas para FISH centromérico.

5.2. Cariótipo de fibroblastos e linfócitos

Dos 15 indivíduos estudados, foram encontradas alterações cromossômicas a partir de linfócitos em quatro sujeitos (casos 2, 7, 12 e 14) sendo que destes, em três a mesma alteração foi evidenciada também em fibroblastos. Os resultados de cariótipo de linfócitos e fibroblastos dos pacientes são apresentados na tabela III. Foi incluída nessa tabela a informação de quais pacientes o material criopreservado de melanócitos está disponível para estudos futuros.

Tabela III: Cariótipo de linfócitos e fibroblastos dos indivíduos estudados.

Caso	Cariótipo Linfócitos	Cariótipo Fibroblastos	M
1	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XX[50] Normopigmentada: 46,XX[50]	+
2	46,XX,t(X;21)(p11;p11)[50]	Hipopigmentada: 46,XX,t(X;21)(p11;p11)[50] Normopigmentada: 46,XX,t(X;21)(p11;p11)[50]	+
3	46,XY[100]	Hipopigmentada: 46,XY[50] Normopigmentada: 46,XY[50]	+
4	46,XX[50]	Não houve crescimento	
5	46,XY[100]	Não houve crescimento	
6	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XY[50] Normopigmentada: 46,XY [50]	
7	6,XX,r(22)[13]/45,XX,- 22[3]/46,XX,dic r(22)[1]/46,XX[83]	Hipo: 46,XX,r(22)[20]/45,XX,-22[4]/46,XX,dic r(22)[2]/46,XX[24] Hiper: 46,XX,r(22)[24]/45,XX,-22[4]/46,XX[22]	+
8	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XX[50] Normopigmentada: 46,XX[50]	+
	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XX[50] Normopigmentada: 46,XX[50]	+
10	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XX[50] Normopigmentada: 46,XX[50]	+
11	46,XX,15p+[50]* Banda NOR negativa	Coleta não realizada	
12	47,XX,+mar[38]/46,XX[12] Bandas NOR e C negativas	Não houve crescimento	
13	46,XX[50]	Hipopigmentada: 46,XX [50] Normopigmentada: 46,XX [50]	
14	47,XY,+18[34]/46,XY[16]	Coleta recusada	
15	46,XY[50]	Hipopigmentada: 46,XY[50] Normopigmentada: 46,XY [50]	

Legenda: M – houve crescimento de melanócitos.

*Esse caso foi considerado heteromorfimo e por isso não foi discutido nesse trabalho.

A tabela IV resume as características clínicas dos indivíduos estudados e as relaciona com as alterações cromossômicas encontradas.

Tabela IV. Resumo das características clínicas dos indivíduos estudados e das alterações citogenéticas encontradas.

CASO	RD/PM	RM ou de fala	cardiopatía	convulsões	assimetria	escoliose	dismorfismos faciais	malformação de dedos	malformação cerebral	alteração ocular	alteração muscular	alteração óssea	hirsutismo	autismo	Cariótipo Linfócitos
1		X		X		X	X								46,XX[50]
2	X		X		X										46,XX,t(X;21)(p11;p11)[50]
3	X							X							46,XY[100]
4	X					X			X						46,XX[50]
5	X	X		X	X		X		X	X	X				46,XY[100]
6	X				X	X	X	X		X	X				46,XX[50]
7	X			X			X				X				46,XX,r(22)[13]/45,XX,-22[3]/46,XX,dic r(22)[1]/46,XX[83]
8	X	X						X							46,XX[50]
9	X			X			X	X	X	X		X			46,XX[50]
10	X	X	X									X			46,XX[50]
11	X							X							46,XX,15p+[50]
12	X	X	X		X		X				X	X			47,XX,+mar[38]/46,XX[12]
13			X				X	X		X					46,XX[50]
14	X						X	X							47,XY,+18[34]/46,XY[16]
15	X			X									X		46,XY[50]

Em um dos indivíduos (caso 7) a alteração foi encontrada em porcentagem consideravelmente maior em fibroblastos.

O quarto paciente (caso 14) compreende um indivíduo para o qual a família não havia autorizado a coleta de pele e que veio a falecer, porém foi feita coleta de esfregaço de mucosa oral.

Algumas culturas de fibroblastos não apresentaram crescimento satisfatório e não foi possível a análise cromossômica. Em um indivíduo não foi possível realizar a biópsia de pele.

5.3. Casos com alterações cromossômicas

5.3.1 Caso 2

Sexo feminino, parda, 11 anos. Apresenta RDNPM, com RM grave, convulsões, escoliose, manchas hipopigmentadas em região lombar seguindo as linhas de Blaschko (figura 13).



Figura 13. Foto da região lombar do caso 2. Fonte: Arquivo DGM/FCM/Unicamp

O cariótipo de linfócitos resultou 46,XX,t(X;21)(p11;p11) em 50 células (figura 14), sendo o mesmo resultado obtido em fibroblastos de ambas as regiões da pele (normopigmentada e hipopigmentada) (figura 15).

O cariótipo da mãe foi normal. No entanto, o cariótipo do pai não pode ser avaliado.

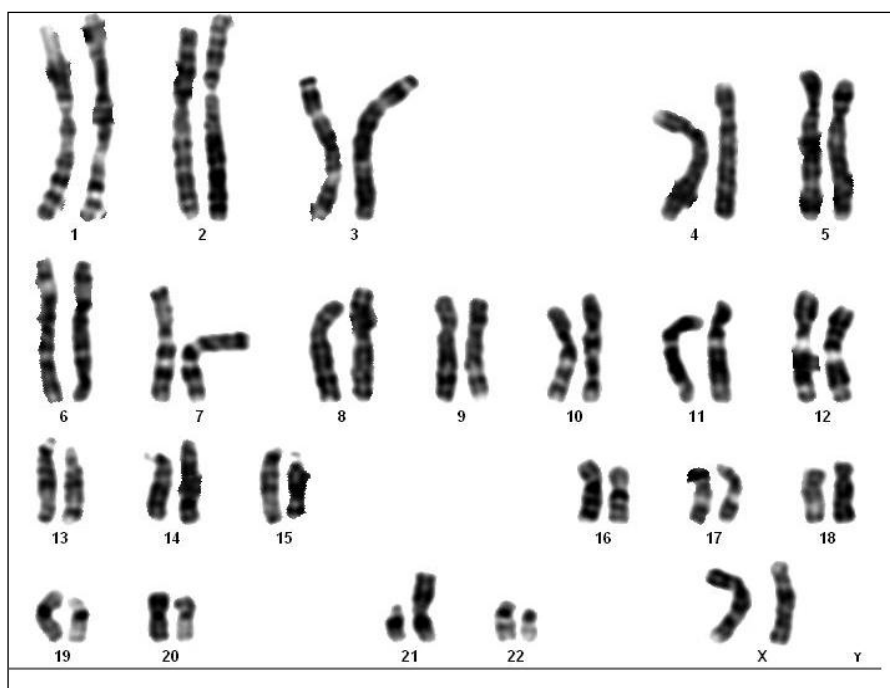


Figura 14. Cariótipo de linfócitos por bandamento G do caso 2: 46,XX,t(X;21)(p11;p11)

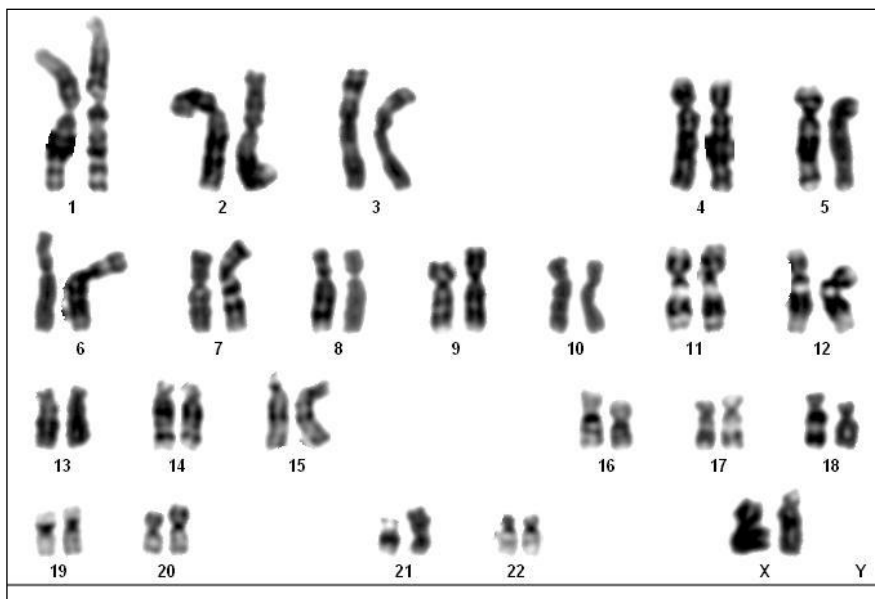


Figura 15. Cariótipo obtido a partir de fibroblastos da região da pele hipopigmentada do caso 2.

Para excluir o envolvimento do centrômero do cromossomo X, foi realizada FISH utilizando a sonda DXZ1 que hibridiza com a região centromérica do cromossomo X. Foram analisadas 20 metáfases, que confirmaram que a translocação envolve o braço p do cromossomo X, já que ambos os sinais foram visualizados no cromossomo X íntegro e no cromossomo X derivado (figura 16).

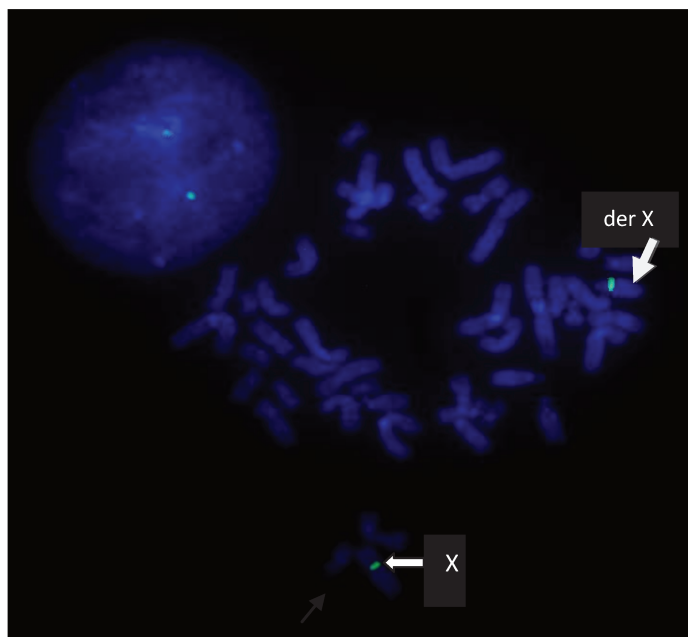


Figura 16: Metáfase obtida através de FISH com a sonda DXZ1. Os sinais em verde marcaram os centrômeros dos cromossomos X e der(X).

A presença de translocação X/autossomo balanceada em indivíduos com MP tipo Ito já havia sido previamente descrita (5, 22,91). Diversos pontos de quebra no cromossomo X foram associados ao MP (de X p21.3 a Xq13) (5, 24,124), Também foi relatado uma paciente com isodissomia Xpter→q21.31 que exibia MP tipo Ito (78).

Considerando a alta frequência de relatos de translocação X/autossomo em indivíduos com esse fenótipo, já havia um estudo brasileiro prévio no qual foi feita uma possível associação da região Xp11 com MP tipo Ito. Na época, os autores consideraram que IP e MP tipo Ito fossem formas alélicas diferentes ou síndromes de genes contíguos (91), entretanto atualmente sabe-se que o gene responsável pela IP localiza-se em Xq26.

Outros autores também sugeriram que a região Xp11 esteja associada a MP do tipo Ito devido à frequência em que translocações envolvendo essa região está associada a esse

fenótipo, independente do autossomo envolvido (5, 9,116,121,167). Tentou-se associar o MP do tipo Ito também ao cromossomo 9, devido aos casos relatados em que o autossomo envolvido na translocação com o cromossomo X era o cromossomo 9 (27,116-118,156). Novamente, com relação ao autossomo, a diversidade de alterações cromossômicas descritas pode refletir a multiplicidade de genes envolvidos no processo de pigmentação espalhados no genoma (22,50).

Em uma revisão de 13 casos de MP tipo Ito com esse tipo de translocação, a distribuição de pontos de quebra em X implicou a região proximal do braço p em oito casos, a região das sequencias alféides (alfa-satélites) em um caso e o braço q proximal em quatro casos (78).

Cerca de ¼ das mulheres heterozigotas com translocação X/autossomo balanceada apresentam um fenótipo anormal, associou-se o fenótipo à dissomia funcional de segmentos do cromossomo X e/ou monossomia funcional de segmentos do autossomo translocados em X devido à extensão da inativação de X naquele segmento (195).

Alguns estudos consideraram que a dissomia funcional em mosaico de Xp está mais relacionada ao envolvimento do SNC em mulheres com translocação X/autossomo e MP do tipo Ito do que a disrupção de genes ligados a X (5,78). Porém, nesses estudos não foi testado disrupção gênica ou micro alterações no ponto de quebra. A dissomia funcional de Xp teria como resultado semelhança com duplicações proximais de Xp ou r(X) (78).

A inativação do cromossomo X é um evento que ocorre no início do desenvolvimento embrionário, de forma aleatória (180-181). O processo de inativação é acompanhado por atraso na iniciação e término da síntese de DNA durante a divisão celular, as chamadas regiões de replicação tardia.

Essas regiões formam um padrão de bandas que permite a identificação do cromossomo X com replicação inicial ou tardia, bem como de outros cromossomos, através do processo de incorporação de 5-BrdU e subsequente coloração. Dessa forma é possível identificar qual o cromossomo X inativo. Esse dado tem grande importância em mulheres portadoras de translocações e/ou mutações ligadas ao X.

Considerando os dados acima, optou-se por realizar estudo de inativação do X por replicação tardia no indivíduo 2, sendo analisadas 35 metáfases em luz UV, nas quais todas

apresentaram inativação do cromossomo X íntegro, demonstrando inativação preferencial do cromossomo X íntegro em 100% da amostra (figura 17).

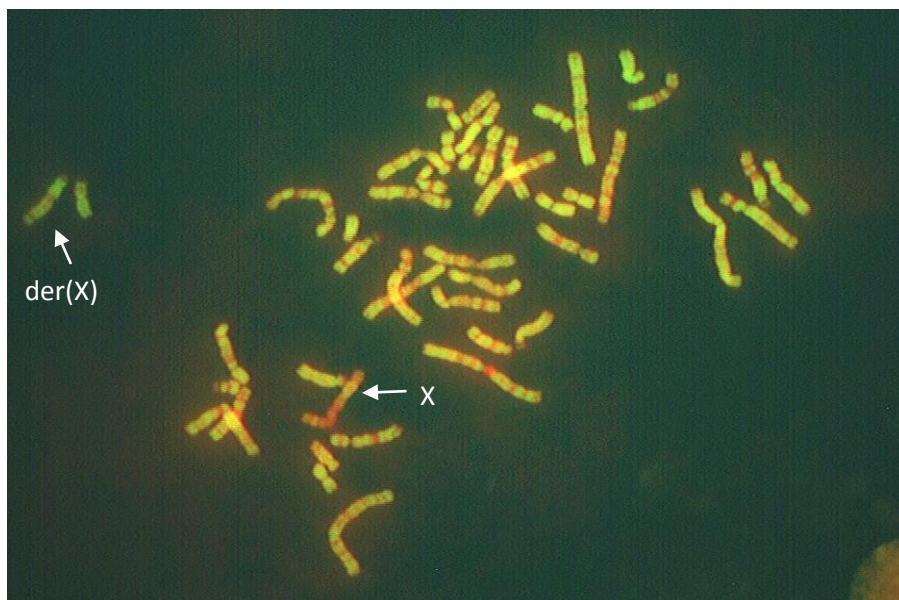


Figura 17: Metáfase de linfócitos por teste de replicação tardia do indivíduo 2, o cromossomo X íntegro está inativado.

Esse resultado descartaria a hipótese de dissomia funcional do cromossomo X. Porém, deve-se salientar que estudos de replicação tardia são limitados devido à interpretação e à análise somente de células em divisão. No estudo de Rivera et al (78) uma análise de padrão de inativação de fibroblastos cultivados da região hipopigmentada encontrou inativação preferencial do X normal. Em análise do DNA da região anormal houve inativação aleatória. Esse dado sugere a seleção negativa da célula com padrão desfavorável no longo período de cultura, que poderia desviar o resultado em testes com amostras cultivadas. Além disso, apesar da maioria dos estudos relatar padrão semelhante de inativação entre fibroblastos e linfócitos, não se pode descartar a hipótese de diferença na proporção de cada tipo celular em diferentes tecidos (196,197).

Um caso descrito por Koiffmann et al (91) com cariótipo 46,XX,t(X;10)(p11;q11) demonstrou replicação tardia do cromossomo X íntegro em todas as metáfases da paciente afetada, como no presente trabalho. Apesar da mãe não apresentar fenótipo associado, seu cariótipo foi igual e o estudo de inativação de X também demonstrou inativação do X íntegro em 100% das células. Foi sugerido que a paciente tivesse mutação gênica *de novo* e o fenótipo poderia ser devido à proporção de células em que o X paterno estava ativo

(íntegro), nesse caso em 100% das células. Nenhuma característica de deleção do cromossomo 10 estava presente no fenótipo, o que exclui a possibilidade de inativação aleatória e consequente monossomia parcial do cromossomo 10 em outros tecidos.

No estudo de Fillipi et al (198) envolvendo um caso com translocação balanceada $t(X;9)$, com ponto de quebra em Xq21, o X normal estava inativado em todas as células, tanto em linfócitos como em fibroblastos, excluindo a hipótese de dissomia funcional.

No caso do indivíduo 2 desse estudo, a translocação envolve o braço p do cromossomo 21, ou seja, o centro de inativação de X não está translocado no cromossomo 21 e não podemos considerar a propagação da inativação do autossomo. A região do cromossomo 21 envolvida é o braço p, região constituída por regiões organizadoras de nucléolo (NOR), a monossomia de 21p não resultaria em fenótipo consistente com o quadro clínico do paciente. Assim, só poderíamos considerar a hipótese de inativação aleatória de X em outros tecidos e consequente fenótipo devido à dissomia funcional de Xp, e não à monossomia do cromossomo 21 (figura 18).

Outro caso de translocação(X;21) havia sido previamente descrito por Smith et al (199) em um natimorto. Entretanto, nesse caso, o braço q do cromossomo X estava translocado no braço q do cromossomo 21, diferindo portanto do presente caso, e sendo sugerido por esses autores que a inativação de Xq translocado resultou em inativação do cromossomo 21 naquela paciente.

Ainda com relação ao estudo de Koiffmann et al (91) os autores sugeriram outra hipótese, decorrente de *crossing-over* entre os cromossomos translocados na meiose materna, gerando gametas que podem apresentar mutação por gene conversão ou formando uma região com *heteroduplex* no ponto de quebra, nestes casos levando à formação de duas populações no indivíduo: uma com a translocação igual à parental, outra com uma disrupção na região da quebra. Esse processo é comum em casos em que os pais têm fenótipo normal na presença de translocação balanceada e os filhos que herdaram essa alteração são portadores do quadro clínico (91).

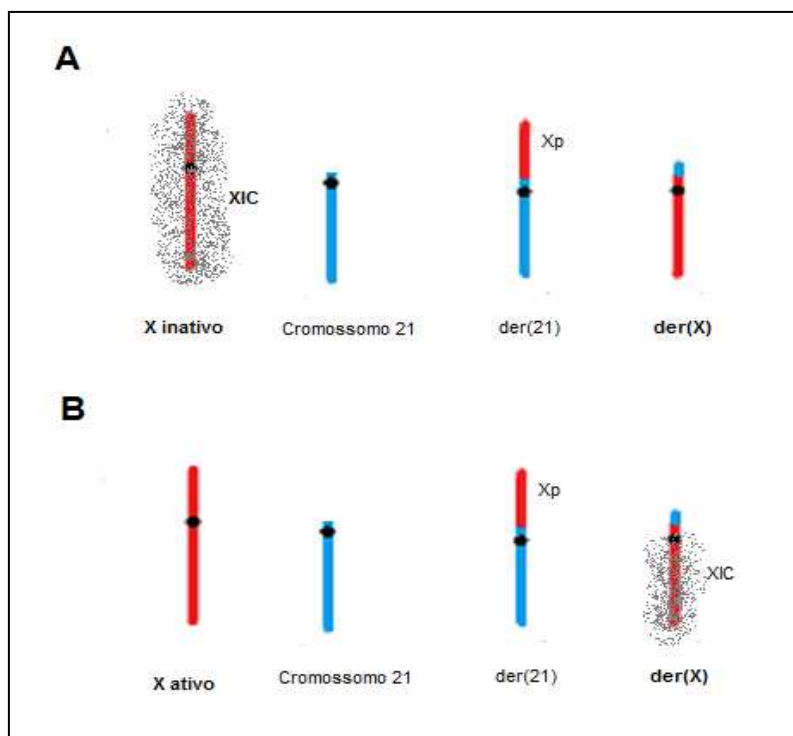


Figura 18. Esquema representativo das hipóteses de inativação do caso 2. O resultado é consistente com a hipótese A. Em B considera-se a hipótese de inativação aleatória de X em outros tecidos, que resultaria em dissomia funcional de Xp.

Considera-se que rearranjos estruturais *de novo* aparentemente balanceados possam determinar o fenótipo em alguns casos (200,201). Assim, o padrão de inativação de X é importante nos casos de indivíduos com MP tipo Ito, mas se devem considerar outros fatores, como deleções ou duplicações submicroscópicas (201). A identificação dessas alterações por citogenética clássica só seria possível se incluísse muitos megabases de DNA, o que é limitado pela resolução da técnica citogenética comumente utilizada.

Zou e Miluski (202) publicaram um caso de uma menina com MP do tipo Ito com duplicação de 7,3 Mb *de novo* na região Xp11.3 a p11.4. O teste de inativação demonstrou inativação aleatória de X e, nesse caso, o fenótipo pode ser explicado por dissomia de Xp na região duplicada. O efeito fenotípico seria o mesmo da dissomia funcional.

Além disso, qualquer gene interrompido no ponto de quebra dos cromossomos envolvidos pode ser potencialmente responsável pelo fenótipo do paciente, bem como o efeito posicional de regiões que controlam a expressão, e a presença de mutações recessivas no cromossomo derivado, que se expressariam quando há desvio no processo de

inativação devido à presença da translocação, também são fatores importantes. (196,203,204). Doenças ligadas ao X em mulheres geralmente são atribuídas ao silenciamento do cromossomo normal e expressão preferencial do cromossomo X que contém o alelo mutante (155,205,206).

Essas alterações submicroscópicas podem determinar mosaicismo genético e não serem diagnosticadas por citogenética, necessitando de técnicas mais sensíveis para sua detecção (29,167). Aneussomias submicroscópicas próximas a pontos de quebra foram relatadas em muitos casos em que as alterações eram aparentemente balanceadas e não estavam em mosaico (106,200,207-209). Esses estudos demonstraram deleções e duplicações críticas, ou disrupção gênica no ponto de quebra.

Foi realizada a técnica de *array-CGH* para a investigação de possíveis alterações cromossômicas submicroscópicas nas regiões envolvidas nos pontos de quebra da translocação.

Essa técnica permite uma análise de alta resolução do genoma e é usada como triagem na detecção de alterações no número de cópias no DNA genômico, ou seja, principalmente deleções e duplicações de sequências do DNA com resolução de poucos pares de base (64,65,183-186).

O método também detecta mosaicismos de baixa frequência. Em um estudo em indivíduos com suspeita de mosaicismo cromossômico e com cariótipo normal, sem indicação clínica para o envolvimento de um cromossomo específico, foram testados 2585 pacientes por aCGH, sendo que houve confirmação de alteração cromossômica em mosaico em 0,4% da amostra (47). Outros casos também com cariótipo inicial normal foram diagnosticados por essa técnica (64, 160, 186-188).

O método é baseado na hibridação da amostra com fragmentos genômicos clonados cuja localização cromossômica exata é conhecida, fornecendo uma detecção detalhada das alterações mapeadas diretamente na sequência genômica (149).

A análise é realizada em DNA de sangue periférico, excluindo interferências da técnica citogenética na detecção de mosaicismo, como já discutido acima (47,160,189). No estudo de Shinawi et al (64) foi encontrado mosaicismo de baixa frequência através de *array-CGH* em quatro indivíduos com MP tipo Ito que técnicas de citogenética e a FISH não detectaram.

Usando os critérios de análise descritos nos métodos, a precisão de mapeamento das alterações seria de aproximadamente 20 Kb, que é o espaçamento médio entre os oligonucleotídeos. O tamanho mínimo das alterações consideradas é de cerca de 50-60 Kb (três oligonucleotídeos), o que está de acordo com o tamanho mínimo recentemente definido para diagnóstico de pacientes com alterações fenotípicas (2nd International Cytogenetic Array Consortium, 15-18 Dez 2008, Bethesda, USA).

Foi detectada apenas uma alteração no número de cópias de DNA (CNV). Tratava-se de uma deleção no cromossomo 15 que depois de comparada ao *Database of Genomic Variants (DGV)*, concluiu-se que tratava-se de uma variante comumente encontrada na população em geral (figura 19).

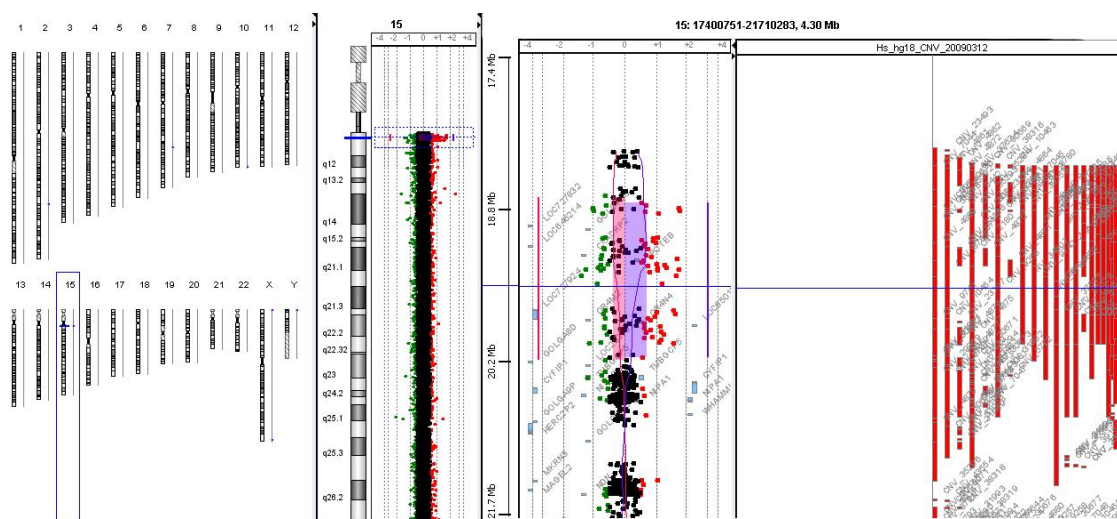


Figura 19. CNV encontrado no cromossomo 15. A. *Genomic Viewer* mostrando a localização da alteração. B. *Chromosome view* mostrando que a deleção foi encontrada em ambos os experimentos. C. *Gene view* na qual se pode observar os diversos CNVs já descritos na literatura.

Portanto, foi excluída a presença de duplicação ou deleção cromossômica acima 50 kb (resolução do *array* utilizado) tanto próxima às regiões envolvidas na translocação (figuras 20 e 21), como também no restante do genoma.

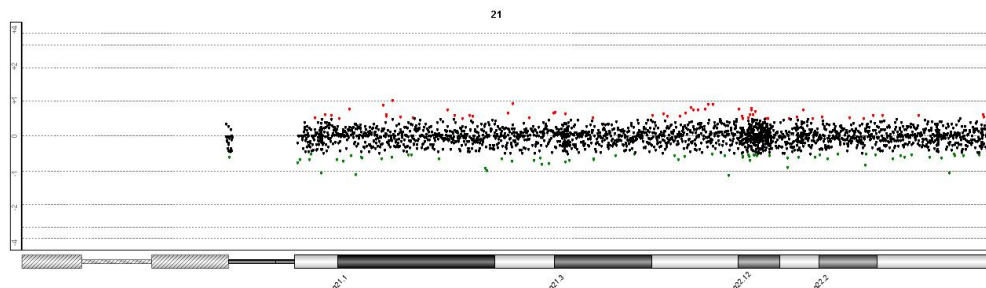


Figura 20. *Chromosome view* mostrando o cromossomo 21 e nenhuma alteração.

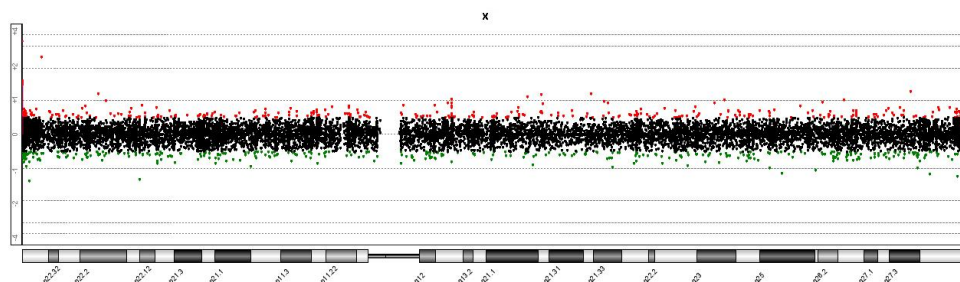


Figura 21. *Chromosome view* mostrando o cromossomo X e nenhuma alteração.

Mesmo diante do resultado negativo para o *array* utilizado, considerando que o presente caso apresenta RM associado à translocação cromossômica envolvendo o cromossomo X, é grande a possibilidade de genes localizados nesse cromossomo terem sido afetados por essa aberração cromossômica, principalmente se considerarmos que aproximadamente 11% dos casos de RM devem-se a alterações cromossômicas (210). E, principalmente, que de 280 genes descritos relacionados a RM, 16% estão localizados em X (211).

A região Xp11 é rica em genes, e oito dos genes presentes nessa região são conhecidamente causadores de doença. Os genes *ATP6AP2*, *CASK*, e *MAOA* estão associados com RM ligado ao X (RMLX) síndrômico, e o gene *ZNF674* a RMLX não síndrômico (202).

O gene *ATP6AP2* (OMIM: 300556) é expresso no cérebro e outros tecidos, defeitos nesse gene estão relacionados a RM leve a moderado associado a epilepsia, retardo motor e déficit de fala. O gene *CASK* (OMIM: 300172) foi associado à RM, microcefalia e hipoplasia cerebelar. E o gene *ZNF674* (OMIM: 300573) foi relacionado à função cognitiva, RM moderado a grave não síndrômico e distúrbio de comportamento.

Nessa região não foram descritos genes relacionados à pigmentação, porém ainda há muitos genes com função não conhecida que poderiam estar relacionados à etiologia dessa condição (202).

Dessa forma, para o caso 2 do presente estudo, pode-se afirmar que:

- Foi excluída a presença de duplicação ou deleção cromossômica acima de 50 kb (resolução do *array* utilizado). A hipótese de deleção ou duplicação seria possível se fosse de regiões menores que a resolução utilizada.

- O fenótipo pode ser devido à dissomia funcional de Xp, se presente em outro tecido que não em linfócitos, apesar de raros estudos terem comprovado essa hipótese;

- A presença de mutações gênicas no cromossomo X derivado pode determinar o fenótipo, considerando que ele está ativo em 100% das células estudadas. Se esse cromossomo tiver origem materna, se justificaria a ausência de fenótipo na mãe que teria inativação aleatória do cromossomo X, uma vez que a mesma não é portadora de translocação.

5.3.2. Caso 7

Sexo feminino, parda, 21 anos. Apresenta como alterações neurológicas RM e epilepsia. Foram encontrados sinais dismórficos como palato alto, hipoplasia de metacarpianos, prega palmar única, sindactilia e unhas hipoplásicas. Apresenta manchas hipocrômicas seguindo as linhas de Blaschko em membros inferiores, tronco e abdômen. O cariótipo de sangue periférico foi 46,XX,r(22)[13]/45,XX,-22[3]/46,XX,dic r(22)[1]/46,XX[83]. Sem antecedentes familiares, o cariótipo da mãe foi normal e o do pai não pode ser avaliado.

Foi analisada amostra de fibroblastos que revelou, na pele hipopigmentada, cariótipo 46,XX,r(22)[20]/45,XX,-22[4]/46,XX,dic r(22)[2]/46,XX[24] e, na pele normal, 46,XX,r(22)[24]/45,XX,-22[4]/46,XX[22] (figura 22).

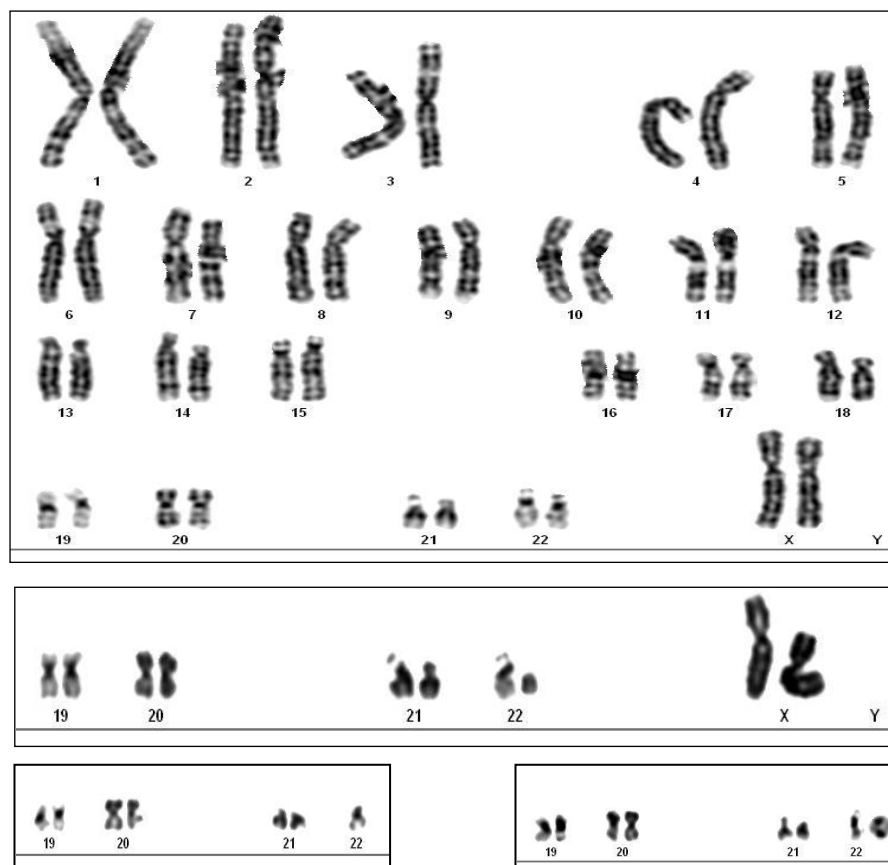


Figura 22. Cariótipo por bandamento G do caso 7, acima cariótipo normal (46,XX) obtido a partir de linfócitos, no centro cariótipo parcial 46,XX,r(22) de fibroblastos. Abaixo cariótipos parciais 45,XX,-22 à esquerda e 46,XX,dic r(22) à direita.

Na literatura especializada há relatos de casos de anéis cromossômicos de todos os cromossomos humanos, geralmente associados a déficit de crescimento, malformações e RM moderado (149). O fenótipo, em geral, ocorre devido a deleções terminais nos cromossomos e seria semelhante a casos de deleção simples dessas regiões. Porém, em adição à deleção primária determinada pela formação do anel, pode ocorrer perda ou ganho de material devido à instabilidade do cromossomo durante as divisões celulares nos casos em que não há perda de material (anel cromossômico completo), ou mesmo devido a ambos os fatores (deleção e instabilidade) (149, 213,214).

Assim, o fenótipo depende do tamanho do anel, da quantidade de eucromatina perdida, da estabilidade do anel, da presença de células aneuplóides secundárias e da porcentagem de mosaicismo (214,215).

Com relação ao anel do cromossomo 22 há cerca de 50 casos publicados (216,217). Dois casos em mosaico estavam associados a MP tipo Ito (ver tabela III). Ritter et al (1) relataram que esses pacientes não teriam um quadro clínico consistente de anomalias, exceto por RM em graus variados, hipotonia, déficit de coordenação, hiperatividade, comportamento agressivo e convulsões.

O estudo de Woods et al (77) apresentou uma menina com cariótipo 46,XX[146]/46,XX,r(22)[5], e 10% de células com presença do anel em fibroblastos. Os autores reiteram não haver quadro clínico consistente. O indivíduo apresentava RDNPM, malformações congênitas da mão esquerda e manchas de hipopigmentação.

A deleção de sequências ribossômicas do braço p dificilmente está relacionada ao quadro clínico, mas a perda de genes do braço q contribui com o fenótipo em indivíduos com deleção terminal de 22q. Casos de deleção em 22q13 apresentam fenótipo similar a r(22) se as deleções forem similares em tamanho entre os dois cariótipos (213, 218).

A síndrome de deleção 22q13.3 (Phelan–McDermid, OMIM # 606232) é causada por deleção, translocação desbalanceada, anel e outras alterações estruturais, que resulta em deleções de tamanhos variados envolvendo a região terminal do braço q do cromossomo 22. Cerca de 100 casos foram publicados, em que as deleções variam de 100 kb a mais de 9Mb. Como fatores comuns há RDNPM (>98%), atraso ou ausência de fala (>98%), hipotonia neonatal (>97%), dismorfismos faciais e comportamento autista (219,220).

A síndrome de deleção sobrepõe os achados de r(22) principalmente por RM moderado a grave e atraso da fala. As diferenças clínicas se devem principalmente ao tamanho da deleção. (213,218,220-222). Em alguns casos foram descritas máculas café-com-leite, MP tipo Ito e NF tipo II (212). Porém, alterações pigmentares são incomuns em pacientes com cromossomo em anel e representariam um sinal clínico de mosaicismismo causado por instabilidade cromossômica (223).

A região de deleção próxima ao telômero é rica em genes, e as menores deleções incluem genes cruciais nessa região: *ARSA*, *SHANK3*, *ACR* e *RABL2B* (220,224) (figura 23a). Em todos os pacientes com deleção terminal de 22q13 pelo menos parte do gene *SHANK3* está deletado, assim, demonstrou-se a haploinsuficiência de *SHANK3* como fator relacionado aos sintomas neurológicos principais (220).

Considerando que portadores de anel de 22 com ponto de quebra distal ao gene *SHANK3* não apresentam sinais clínicos, provavelmente esse gene é o responsável pelo fenótipo da síndrome de deleção (225).

Para prosseguir a investigação dessa paciente e determinar possível deleção no cromossomo r(22), utilizou-se a sonda *dual core* MD DiGeorge "TUPLE 1" (22q11)/(22q13), que tem sequência na região do gene *ARSA*, a 180 kb do telomero, e uma sequência proximal usada como controle (figura 23b).

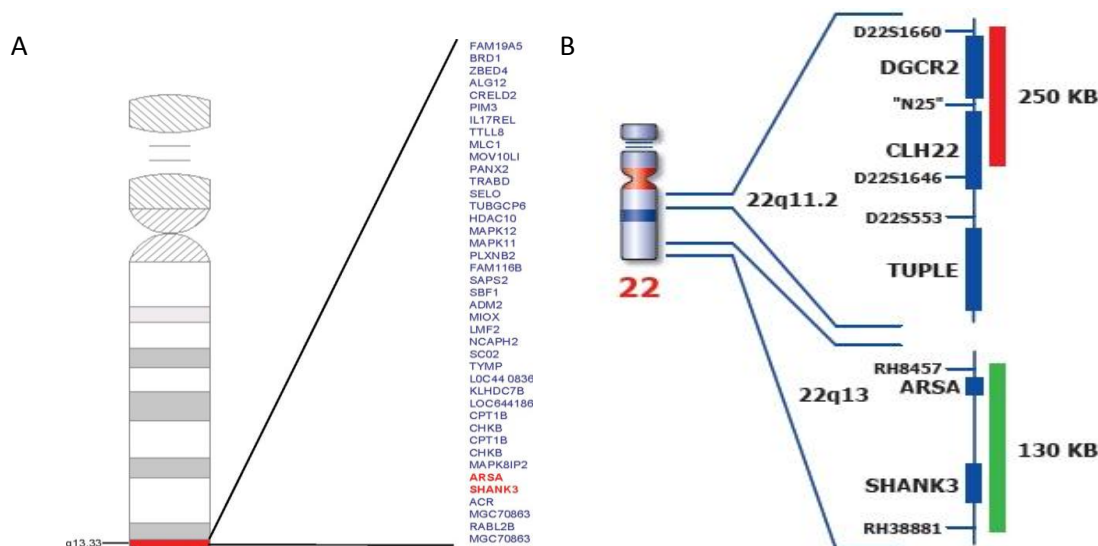


Figura 23. À esquerda cromossomo 22 e caracterização dos genes presentes em 22q terminal Fonte: Jobanputra et al, 2008. À direita esquema representativo das sondas utilizadas nesse estudo. Fonte: Catálogo on line Kreatech/Poseidon.

Com essa técnica é possível a triagem de centenas de células de forma rápida e com resolução superior à citogenética convencional (80 a 200 kb), possibilitando, assim, melhor identificação de regiões específicas, mesmo que em mosaïcismo com baixa frequência (47,187).

Com essa técnica verificou-se a deleção da região terminal (q13.3) do cromossomo 22 em anel e confirmou-se a presença de três linhagens celulares, uma contendo o cromossomo 22 em anel, uma com perda do anel de 22 e uma linhagem normal (figura 24). Resultado de FISH: 46,XX,r(22).ishr(22)(TUPLE1+,ARSA-)[5]/45,XX,-22.ish 22q11.2(TUPLE1x1),22q13.3(ARSAx1)[2]/46,XX.ish22q11.2(TUPLE1x2),22q13.3 (ARSAx2)[93]. Outros estudos utilizando várias sondas de FISH ou técnica de *array*-CGH

seriam necessários para caracterização da deleção e mapeamento do ponto de quebra do anel de 22.

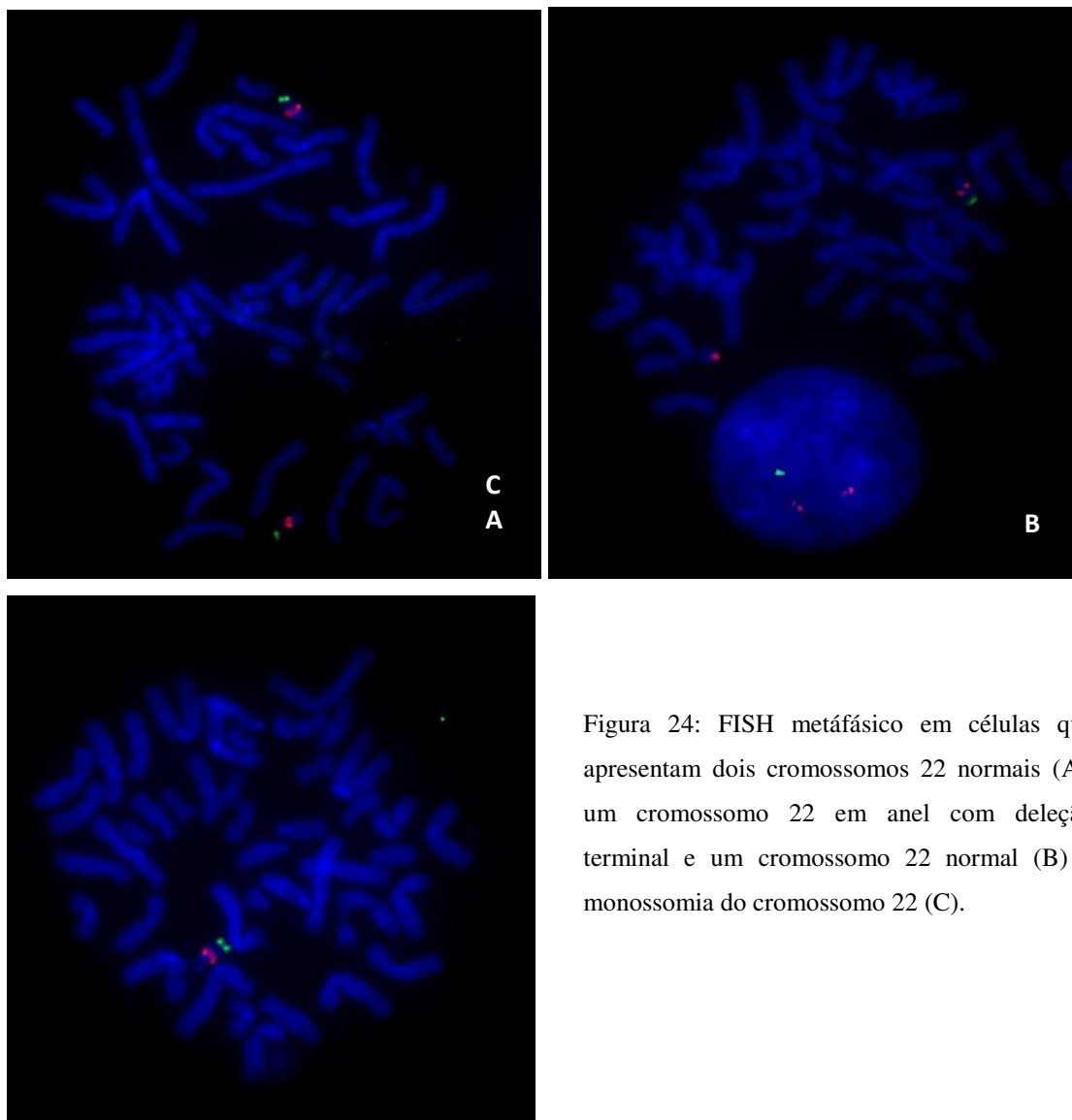


Figura 24: FISH metáfásico em células que apresentam dois cromossomos 22 normais (A), um cromossomo 22 em anel com deleção terminal e um cromossomo 22 normal (B) e monossomia do cromossomo 22 (C).

Como mencionado, a instabilidade do anel pode estar associada ao efeito fenotípico. A estrutura do anel, por si, faria o cromossomo instável durante a divisão celular, e consequentemente levaria à formação de alterações secundárias que tornam variável o número e estrutura desses cromossomos nas células somáticas do indivíduo, um processo chamado mosaicismo dinâmico tecido específico (212,214). As aberrações secundárias mais frequentes são, em ordem de frequência, anéis dicêntricos, dois ou três dicêntricos na mesma célula, anéis abertos e fragmentos cromossômicos (214). Esse fator é determinado

pela permuta de cromátides irmãs durante a mitose, que pode levar à formação de anel duplo ou dicêntrico, como não podem sobreviver devido ao desequilíbrio genético, essas células se perdem nas divisões, com aumento da mortalidade celular (Lejeune, 1968 *apud* Denayer, et al (212))(214,215, 221).

A morte celular pode levar à diminuição do número de células viáveis num dado intervalo de desenvolvimento (223). O déficit de crescimento que ocorre em alguns pacientes portadores de anel cromossômico, bem como outras alterações menos comuns, podem ser devido a perdas do cromossomo durante o desenvolvimento fetal, provavelmente por atraso anafásico e consequente formação de mosaico com células com monossomia de 22, que vão sofrendo seleção negativa e diminuindo a proporção com as divisões celulares. O envolvimento de órgãos e tecidos vai variar de acordo com a perda dessas células. (218).

A instabilidade pode levar à variações na dosagem dos genes em cada célula como pela formação de anéis dicêntricos que resulta em fenótipo mais grave (214). A presença de anéis duplos pode levar à duplicação das regiões presentes no anel, três cópias dessa região em algumas células pode ser suficiente para o fenótipo ser semelhante a síndrome do olho de gato (“cat-eye syndrome”), decorrente de duplicação 22q11.2. Essa é uma condição rara em que há atresia anal, defeitos cardíacos, urogenitais, dismorfismos faciais, alterações oculares (tipicamente coloboma ocular) e RM leve a moderado. Mesmo que o anel duplo esteja presente em poucas células, é provável que estivesse numa frequência maior no início do desenvolvimento e tenham se perdido, desencadeando o fenótipo mais prevalente no início do desenvolvimento embrionário quando as malformações se estabelecem (212).

No estudo de Kosztolányi et al (215) os autores estabeleceram que um anel pode ser considerado estável se a aberração secundária for encontrada em até 5% das mitoses e instável se ocorrer em mais de 5%. Tsukino et al. (226) e Riley et al (227) observaram aumento da frequência do anel em culturas com tempo prolongado, o primeiro autor relata que seria devido a uma instabilidade do anel *in vivo* (226) para o segundo seria resultado de perda *in vitro* (227), ambos os autores consideraram que essas células não são viáveis *in vivo*. Considera-se a instabilidade do cromossomo r(22) rara quando comparada com outras síndromes de anel cromossômico (222).

Alguns estudos encontraram estabilidade diferenciada do cromossomo em anel em diferentes tecidos (214). No estudo de Kosztolányi et al (228) houve instabilidade do anel

em ambos tipos celulares, bem como em linfócitos com pouco tempo de cultura, sugerindo que há inviabilidade celular associada à instabilidade do anel cromossômico *in vitro* e *in vivo*, os autores sugerem que possivelmente essa seja a causa do fenótipo desses pacientes.

O estudo de Sodre et al (214) revelou a presença de anomalias secundárias em todos os tempos de cultura de linfócitos e considerou que as células derivadas de instabilidade de anel cromossômico podem se multiplicar e sobreviver *in vivo* e influenciar na variação fenotípica desses pacientes.

Para determinar diferença na proporção de células encontradas de cada linhagem e verificar a presença de alterações secundárias foi realizado FISH interfásico com linfócitos cultivados e por preparação direta (PD). Esse procedimento pode contribuir para diferenciar a proporção de possíveis alterações que ocorrem *in vitro*, excluindo interferentes tais como análise de células em divisão somente, tempo de cultura e proliferação preferencial de alguma linhagem celular.

Com a análise de FISH interfásico de linfócitos cultivados foram encontrados 258 núcleos com dois sinais verdes e dois sinais vermelhos, indicando dois cromossomos 22 normais (54%), 191 núcleos com um sinal verde e dois sinais vermelhos, indicando presença do anel cromossômico de 22 (39,8%) e 30 núcleos com um sinal verde e um sinal vermelho, indicando monossomia do cromossomo 22, ou seja, perda do anel cromossômico (6,2%) (figura 25).

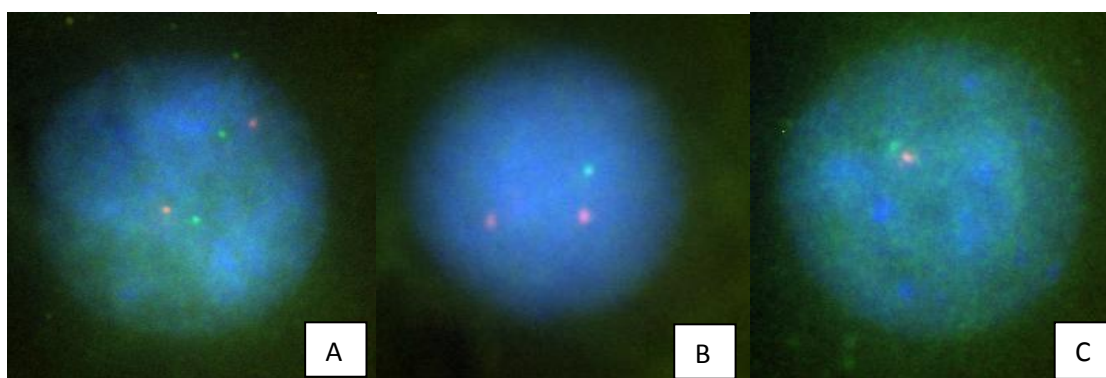


Figura 25. FISH interfásico de linfócitos mostrando núcleos com dois sinais verdes e dois sinais vermelhos (A), indicando cariótipo normal, núcleos com um sinal verde e dois sinais vermelhos (B), indicando presença do anel cromossômico e núcleos com um sinal verde e um sinal vermelho (C), indicando perda do cromossomo 22 em anel.

A partir de preparação direta do material de linfócitos foram encontrados 384 núcleos indicando dois cromossomos 22 normais (77,1%), 91 núcleos indicando presença do anel cromossômico (18,3%) e 23 núcleos indicando monossomia do cromossomo 22, ou seja, perda do anel cromossômico (4,6%).

No presente estudo encontrou-se variação na proporção de células com r(22), de células com anel duplo e com monossomia de 22 em linfócitos se comparados com fibroblastos, bem como de PD em comparação com linfócitos cultivados (Tabela V).

Tabela V. Resultados de cariótipo e FISH obtidos do caso 7

Linhagem	Linfócitos				Fibroblastos	
	<i>Cariótipo</i>	<i>FISH</i> <i>metafásico</i>	<i>FISH</i> <i>interfásico</i>	<i>FISH</i> <i>interfásico PD</i>	<i>Cariótipo</i> <i>hipopigmentada</i>	<i>Cariótipo</i> <i>normopigmentada</i>
46,XX	83 (83%)	93 (93%)	258 (54%)	384 (77,1%)	24 (48%)	22 (44%)
46,XX,r(22)	13 (13%)	5 (5%)	191 (39,8%)	91 (18,3%)	20 (40%)	24 (48%)
46,XX,dic r(22)	1 (1%)	--	--	--	2 (4%)	--
45,XX,-22	3 (3%)	2 (2%)	30 (6,2%)	23 (4,6%)	4 (8%)	4 (8%)
Total	100	100	479	498	50	50

Legenda: PD: preparação direta

A análise de FISH interfásico de linfócitos cultivados diferencia a proporção entre as linhagens celulares encontrada em metáfases. Esse fato pode ser explicado pois a análise de células em divisão descarta células interfásicas que podem ter um ciclo celular diferenciado e não estar em divisão naquele momento da cultura.

A linhagem normal (46,XX) foi mais freqüente em preparação direta de linfócitos, em cariótipo e em FISH metafásico, indicando possível seleção das células alteradas *in vivo* e/ou melhor proliferação das células normais *in vitro*.

Observou-se maior frequência do anel cromossômico (46,XX,r(22)) em fibroblastos e em FISH de linfócitos cultivados, a menor proporção dessa linhagem em PD sugere menor frequência *in vivo*. A linhagem com anel dicêntrico (46,XX,dic r(22)) foi encontrada

em fibroblastos e cariótipo convencional, sendo considerada, portanto, alteração secundária *in vitro*.

A linhagem celular com monossomia do cromossomo 22 (46,XX,-22), ou seja, perda do anel cromossômico, foi encontrada em maior porcentagem na cultura de fibroblastos, considerando ser uma cultura de longa duração, pode ser entendida como uma alteração *in vitro*. Porém, foi encontrada a mesma proporção dessas células em duas culturas de fibroblastos independentes e com diferente tempo de cultura, assim, acredita-se que realmente seja representativo da diferente frequência entre os tecidos. Além disso, a preparação direta de linfócitos apresentou também essa linhagem, descartando ser artefato da cultura, ou seja, há presença dessa terceira linhagem *in vivo*.

O quadro clínico da paciente, apesar de apresentar fatores inespecíficos, está em acordo com as descrições para indivíduos com deleção terminal do cromossomo 22. O mosaïcismo pigmentar visualizado clinicamente é determinado pela presença de duas linhagens celulares: normal e com anel do cromossomo 22, e possivelmente também pela presença de uma terceira linhagem representada por perda do anel cromossômico.

5.3.4. Caso 12

Sexo feminino, branca, quatro anos. Apresenta RDNPM, disfasia, cardiopatia congênita, hérnia umbilical, palato alto, cúbito valgo, hipoplasia de metacarpos e metatarsos, distância intermamilar aumentada, hirsutismo, hipertricose e baixa implantação das orelhas. As alterações pigmentares foram caracterizadas por manchas hipopigmentadas em face, tronco e, nos membros, estrias de hipopigmentação. O único antecedente familiar relacionado é uma tia materna com cardiopatia congênita.

O cariótipo de linfócitos foi 47,XX,+mar[38]/46,XX[12]. O cariótipo dos pais foi normal. Não houve crescimento da cultura de fibroblastos. Ainda em linfócitos foi realizado Banda NOR e Banda C para tentar caracterizar melhor o cromossomo marcador. Ambas foram negativas (figura 26).

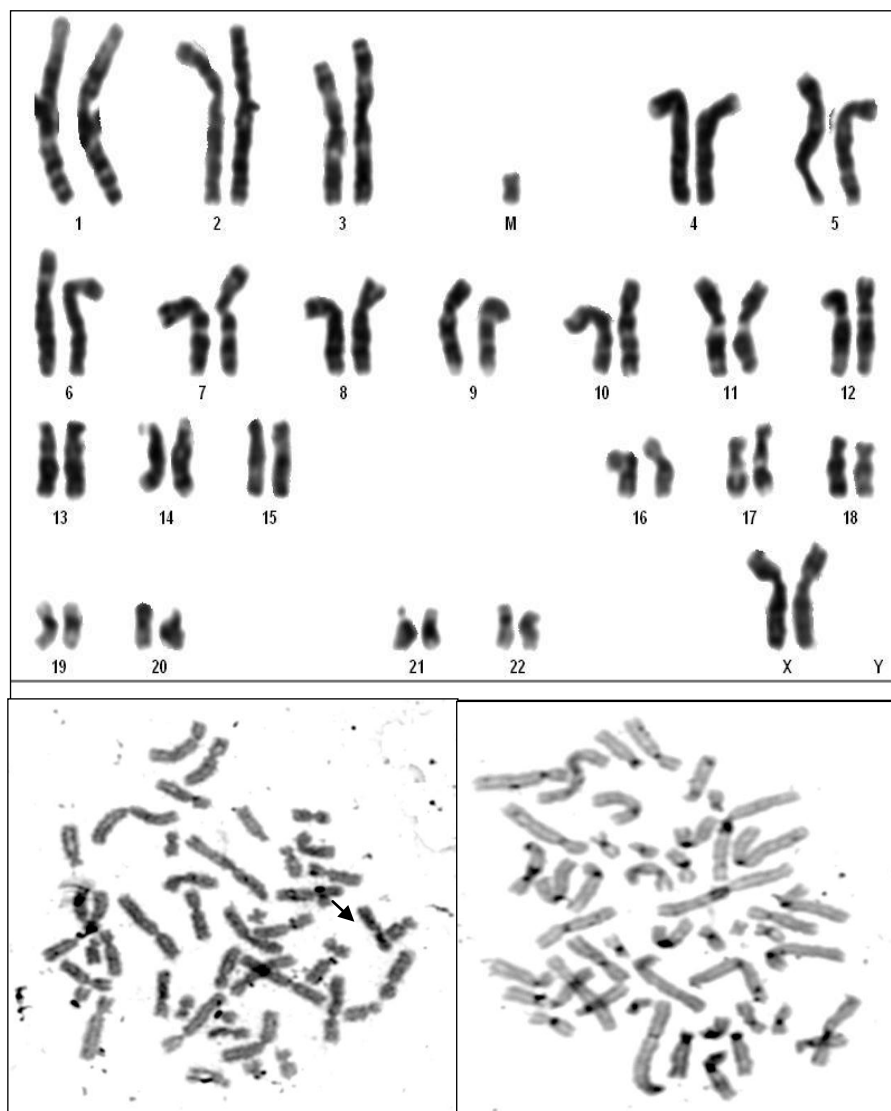


Figura 26. Cariótipo obtido a partir de linfócitos do caso 12, apresentando cariótipo 47,XX,+mar[38]/46,XX[12] por bandamento G. Abaixo à esquerda metáfase com banda NOR, marcador indicado por seta com marcação negativa. À direita metáfase por bandamento C, marcador com banda C negativa.

A partir da coloração com bandamento NOR é possível marcar regiões organizadoras de nucléolos (NOR), presentes no braço p de cromossomos acrocêntricos. Porém, apenas as regiões NOR ativas são marcadas com essa técnica. Dessa forma esta não é uma técnica muito específica, pois o cromossomo pode ser um acrocêntrico e não ser corado pela marcação, se a região NOR estiver inativa. Assim, se houver marcação a técnica é informativa, determinando ser o marcador de origem de acrocêntrico. Caso não haja marcação, como nesse caso, a técnica não é informativa pois não exclui a origem em acrocêntrico (178).

O bandamento C marca regiões de heterocromatina. A não marcação mostra que pode se tratar de um cromossomo acêntrico. Ou seja, o marcador é derivado de região cromossômica não constituída de heterocromatina, logo, não tem centrômero (178). A estabilidade do marcador, nesses casos, deve-se à possível formação de um neocentrômero (229).

Assim, nesse caso foi verificado um cromossomo marcador que não tem região NOR ativa e não apresentou marcação por bandamento C, o que sugere não possuir região centromérica.

Murthy et al (229) relataram uma paciente com MP tipo Ito com 47,XX,+mar, a marcação por banda NOR e banda C foram negativas. FISH com sondas alfa-satélites confirmaram que o marcador era acêntrico, porém altamente estável em culturas de fibroblastos, sugerindo a formação de neocentrômero. Através de *array*-CGH foi confirmado ser derivado do cromossomo 3. Marcadores analfóides são raros, eles não contêm sequências de DNA centroméricas ou alfa-satélites e sua estabilidade depende da formação de um neocentrômero.

Define-se um cromossomo marcador supranumerário como um cromossomo adicional, de origem e composição não definidas por técnicas citogenéticas (230). Esses cromossomos têm ocorrência de 0,3:1.000 em recém-nascidos e de 3,27:1.000 em população com RM (231). A maioria tem origem *de novo* e cerca de 59% dos casos ocorrem em mosaico (229).

Estudo com marcadores com FISH demonstraram que podem ter origem de qualquer cromossomo, mas não foram encontrados marcadores com origem do

cromossomo 5. Em geral, cerca de 4/5 são derivados de cromossomos acrocêntricos e, desses, metade são derivados do cromossomo 15 (230).

A origem do cromossomo marcador nem sempre pode ser definida por sondas centroméricas, constituídas por sequências alfa-satélite. Como no caso do presente estudo, o cromossomo marcador pode não ter sequências pericentroméricas ou podem ser compostos por DNA repetitivo de outras classes que não detectados por essas sondas. Nesses casos a identificação pode ser facilitada com sondas de pintura cromossômica ou FISH reverso (232).

O risco de RDNPM e/ou anormalidades físicas na presença de cromossomo marcador derivado de autossomo não-acrocêntrico é de aproximadamente 30% (233). Em alguns casos pode ser feita correlação entre o fenótipo e o conteúdo do marcador, que varia de normal a grave, dependendo da região cromossômica envolvida e da quantidade de eucromatina, bem como da porcentagem de mosaicismo (232,234).

A identificação do cromossomo é importante para entender o fenótipo. Porém, apesar de os casos descritos relatarem origens variadas dos marcadores, o número não é suficiente para sugerir boa correlação genótipo-fenótipo, exceto para os cromossomos 15 e 22, em que o fenótipo é bem descrito (229).

Assim, no presente estudo a paciente observou-se a presença de cromossomo marcador em linfócitos (76% das células), que possivelmente não apresenta heterocromatina e região NOR ativa. Técnicas como *array*-CGH ou FISH podem contribuir para a identificação da origem desse cromossomo marcador, definir o cariótipo da paciente e, a partir disso, possibilitar a correlação genótipo fenótipo.

5.3.4. Caso 14

Sexo masculino, pardo, nove meses de idade. Apresentava RDNPM, sopro cardíaco e CIA, sinofre, microstomia, camptodactilia, hemiatrofia cerebral. As alterações cutâneas incluíam hemangioma em face anterior da coxa esquerda, manchas hiperpigmentadas em hemitórax e hemiabdomen esquerdo, respeitando a linha média, com áreas de hipopigmentação nessa região, em rodadoinhos estendendo-se ao dorso e ao membro inferior esquerdo. O cariótipo de linfócitos foi 47,XY,+18[34]/ 46,XY[16] (figura 27).

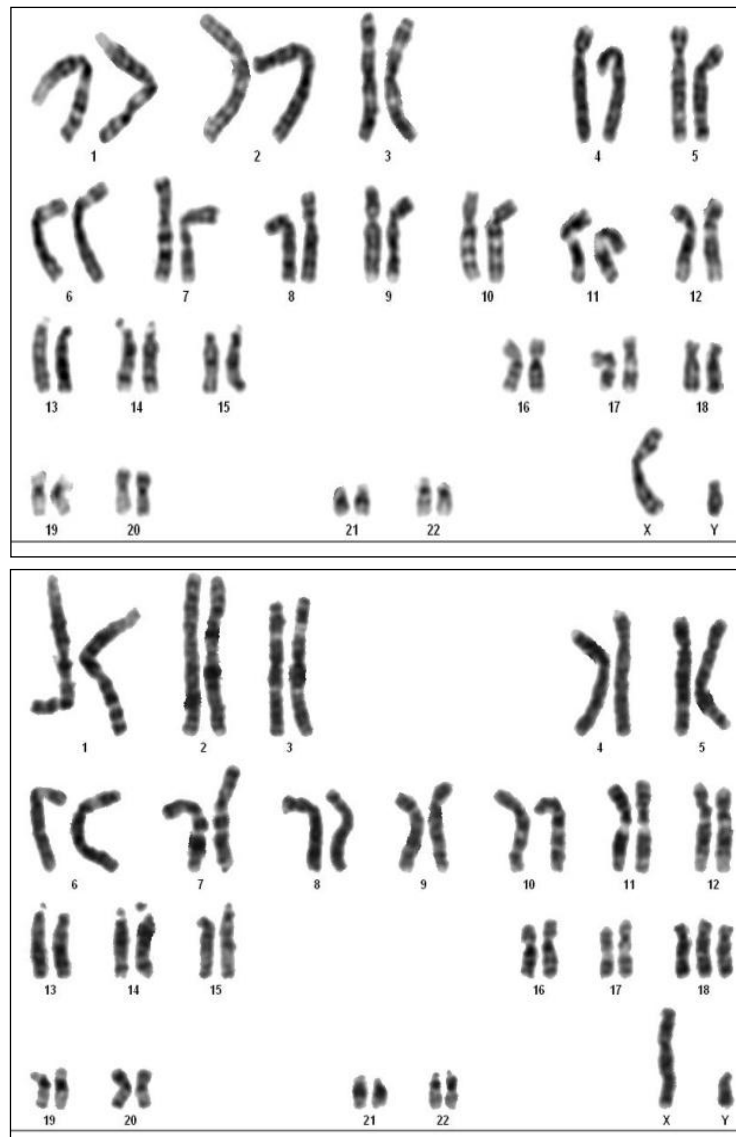


Figura 27. Acima, cariótipo normal 46,XY do caso 14. Abaixo cariótipo 47,XY,+18.

A princípio, o responsável legal pela criança recusou a coleta de biópsia de pele. Com base em dados de origem embriológica, foi coletado esfregaço de mucosa oral. Essas células também têm origem ectodérmica e provavelmente apresentam padrão de mosaicismo diferente do encontrado em linfócitos. O material foi fixado para complementação do estudo com FISH para determinar possíveis diferenças na proporção de células afetadas. A criança faleceu aos 18 meses de idade por infecção aguda do trato respiratório.

Geralmente a trissomia do cromossomo 18 resulta de não-disjunção na meiose II materna. O fenótipo de indivíduos com trissomia do cromossomo 18 é bem estabelecido, porém em estado de mosaico o quadro clínico é variável (235). Entre indivíduos com trissomia 18, o mosaicismo está presente em 10% dos casos (236). A sobrevivência além de 10 anos de indivíduos com trissomia 18 é rara, geralmente tais indivíduos apresentam mosaicismo quando se estuda outro tecido. Além disso, apresentam RM grave e com várias anomalias somáticas (141).

Relata-se assimetria facial e de membros, escoliose, alterações na implantação da orelha, micrognatia, palato alto, braquidactilia, clinodactilia do 5º dedo, defeitos do septo ventricular, estenose pulmonar, malformações cardíacas e renais inespecíficas, hipoplasia genital, hipogonadismo, desenvolvimento sexual e fertilidade normais. Em alguns pacientes ocorrem alterações pigmentares, sendo essas inferidas ao estado de mosaicismo cromossômico (16, 144). Como para os demais cromossomos, nos casos de mosaicismo para trissomia 18 o quadro clínico varia de acordo com a porcentagem da linhagem alterada nos diferentes tecidos (144).

Entre indivíduos com MP tipo Ito, a trissomia do cromossomo 18 é frequente. Do levantamento realizado da literatura (tabela II), foram encontrados relatos de 12 pacientes com MP tipo Ito associado a cariótipo que incluiu trissomia 18.

Slavotinek et al (235) publicaram dois casos de trissomia 18 associado a MP tipo Ito em que uma apresentou trissomia em 100% das células em linfócitos e, em fibroblastos, cariótipo 47,XX, +i(18)(p10)[47]/47,XX,+18[9]/46,XX[4].

Ukita et al (144) relataram uma mulher com mosaicismo do cromossomo 18 em baixa frequência. O fenótipo incluía inteligência normal e displasia pigmentar, considerado MP do tipo Ito. Essa paciente teve uma filha com trissomia 18 que apresentava déficit auditivo, fenda labial e anomalias congênitas múltiplas. O segundo caso do mesmo estudo era o de uma criança com displasia pigmentar seguindo as linhas de Blaschko, sugerindo mosaicismo cromossômico, sem características clínicas de trissomia do 18 em mosaico ou não.

Análise por FISH com sonda centromérica do cromossomo 18 em células de mucosa oral (figura 28) demonstrou proporção inversa de células trissômicas em

comparação com o cariótipo de linfócitos. Para esse tecido o cariótipo foi 47,XX,+18[33]/46,XX[67].

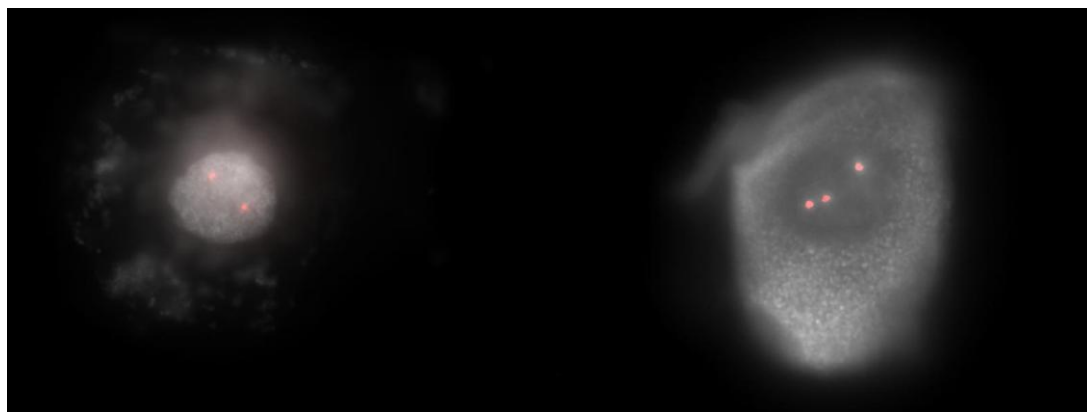


Figura 28: FISH interfásico em células da mucosa oral do caso 12. À esquerda célula apresentando dois sinais vermelhos,correspondentes a dois cromossomos 18. À direita célula apresentando três sinais vermelhos correspondentes ao cromossomo 18.

Diante dessa divergência entre os tecidos pode-se considerar diferente proporção de células normais e de células alteradas entre derivados da mesoderme e derivados da ectoderme, tecido diretamente relacionado ao quadro de MP do tipo Ito. Porém, também deve-se salientar que o material de mucosa oral não foi cultivado, ao contrário dos linfócitos. Assim, também pode ser representativo de divergência entre a proporção das diferentes linhagens celulares *in vivo* e *in vitro*.

O caso do presente estudo apresentou malformações cardíacas e cerebrais. O quadro visual de mosaicismo pigmentar é explicado pela presença de duas linhagens celulares. Porém, diante do falecimento do paciente, decorrente de uma pneumonia, não foi possível maior correlação entre diferentes tecidos ou estudos complementares do caso.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Com relação às culturas de células:
 - ✓ Foi definido protocolo a partir das culturas celulares obtidas, sendo o mesmo adequado para análise citogenética de queratinócitos em amostras teste;
 - ✓ Foram obtidos avanços nas culturas e preparação cromossômica de melanócitos. Dentro do tempo desse estudo, porém, não foi possível estabelecer análise citogenética adequada de melanócitos;
 - ✓ As amostras teste responderam ao protocolo para estudo citogenético de queratinócitos, entretanto o mesmo não ocorreu com as amostras oriundas dos pacientes. Supõe-se que o distúrbio de base desses indivíduos possa interferir no protocolo desenvolvendo, o que indicaria a necessidade de protocolo diferenciado;
 - ✓ A cultura de células da epiderme é um procedimento complexo, inviável para diagnóstico citogenético dos pacientes até o momento. Porém, se eventualmente estabelecida, poderá contribuir para elucidar melhor os casos de Mosaico Pigmentar;
- Com relação às alterações citogenéticas detectadas nos indivíduos com MP tipo Ito:
 - ✓ Encontrou-se alteração citogenética em linfócitos e fibroblastos em quatro de 15 indivíduos (26,6% da amostra);
 - ✓ Para cada indivíduo, as alterações citogenéticas encontradas em fibroblasto foram as mesmas vistas em linfócitos;
 - ✓ Não houve diferença entre as regiões normopigmentada e hipopigmentadas no estudo citogenético em fibroblastos;
 - ✓ Apenas um caso apresentou diferença na proporção de células alteradas em fibroblastos e linfócitos, podendo ser explicada pelo fato de anéis cromossômicos terem maior instabilidade *in vitro* em culturas de longa duração;
 - ✓ Houve apenas um caso de alteração cromossômica não em mosaico, representada por uma translocação X/autossomo balanceada, para a qual as técnicas de estudo utilizadas não detectaram justificativa para o padrão de mosaicismo observado clinicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ritter CL, Steele MW, Wenger SL, Cohen BA. Chromosome mosaicism in hypomelanosis of Ito. *Am J Med Genet.* 1990 Jan;35(1):14-7.
2. Kuster W, Konig A. Hypomelanosis of Ito: no entity, but a cutaneous sign of mosaicism. *Am J Med Genet.* 1999 Aug 6;85(4):346-50.
3. Horn D, Happle R, Neitzel H, Kunze J. Pigmentary mosaicism of the hyperpigmented type in two half-brothers. *Am J Med Genet.* 2002 Sep 15;112(1):65-9.
4. Di Lernia V. Linear and whorled hypermelanosis. *Pediatr Dermatol.* 2007 May-Jun;24(3):205-10.
5. Hatchwell E, Robinson D, Crolla JA, Cockwell AE. X inactivation analysis in a female with hypomelanosis of Ito associated with a balanced X;17 translocation: evidence for functional disomy of Xp. *J Med Genet.* 1996 Mar;33(3):216-20.
6. Jelinek JE, Bart RS, Schiff SM. Hypomelanosis of Ito ("incontinentia pigmenti achromians"). Report of three cases and review of the literature. *Arch Dermatol.* 1973 Apr;107(4):596-601.
7. Glover MT, Brett EM, Atherton DJ. Hypomelanosis of Ito: spectrum of the disease. *J Pediatr.* 1989 Jul;115(1):75-80.
8. Donnai D, Read AP, McKeown C, Andrews T. Hypomelanosis of Ito: a manifestation of mosaicism or chimerism. *J Med Genet.* 1988 Dec;25(12):809-18.
9. Pascual-Castroviejo I, Roche C, Martinez-Bermejo A, Arcas J, Lopez-Martin V, Tendero A, et al Hypomelanosis of ITO. A study of 76 infantile cases. *Brain Dev.* 1998 Jan;20(1):36-43.
10. Verghese S, Newlin A, Miller M, Burton BK. Mosaic trisomy 7 in a patient with pigmentary abnormalities. *Am J Med Genet.* 1999 Dec 22;87(5):371-4.
11. Ruiz-Maldonado R, Toussaint S, Tamayo L, Laterza A, del Castillo V. Hypomelanosis of Ito: diagnostic criteria and report of 41 cases. *Pediatr Dermatol.* 1992 Mar;9(1):1-10.
12. Nehal KS, PeBenito R, Orlow SJ. Analysis of 54 cases of hypopigmentation and hyperpigmentation along the lines of Blaschko. *Arch Dermatol.* 1996 Oct;132(10):1167-70.
13. Loomis CA. Linear hypopigmentation and hyperpigmentation, including mosaicism. *Semin Cutan Med Surg.* 1997 Mar;16(1):44-53.
14. Ruggieri M, Pavone L. Hypomelanosis of Ito: clinical syndrome or just phenotype? *J Child Neurol.* 2000 Oct;15(10):635-44.
15. Chethan CJA, K T; Sukumar D; Nanda Kishore, B. HYPOMELANOSIS OF ITO. *Ind J Dermatol.* [journal article]. 2006;51(1):2.
16. Thomas IT, Frias JL, Cantu ES, Lafer CZ, Flannery DB, Graham JG, Jr. Association of pigmentary anomalies with chromosomal and genetic mosaicism and chimerism. *Am J Hum Genet.* 1989 Aug;45(2):193-205.
17. Flannery DB. Pigmentary dysplasias, hypomelanosis of Ito, and genetic mosaicism. *Am J Med Genet.* 1990 Jan;35(1):18-21.

18. Sybert VP, Pagon RA, Donlan M, Bradley CM. Pigmentary abnormalities and mosaicism for chromosomal aberration: association with clinical features similar to hypomelanosis of Ito. *J Pediatr*. 1990 Apr;116(4):581-6.
19. Bocian E, Mazurczak T, Bulawa E, Stanczak H, Rowicka G. Triple structural mosaicism of chromosome 18 in a child with MR/MCA syndrome and abnormal skin pigmentation. *J Med Genet*. 1993 Jul;30(7):614-5.
20. Eussen BH, Bartalini G, Bakker L, Balestri P, Di Lucca C, Van Hemel JO, et al An unbalanced submicroscopic translocation t(8;16)(q24.3;p13.3)pat associated with tuberous sclerosis complex, adult polycystic kidney disease, and hypomelanosis of Ito. *J Med Genet*. 2000 Apr;37(4):287-91.
21. Schmidt H, Uhrig S, Lederer G, Murken J, Speicher MR, Schuffenhauer S. Mosaicism for a dup(12)(q22q13) in a patient with hypomelanosis of Ito and asymmetry. *J Med Genet*. 2000 Oct;37(10):804-7.
22. Taibjee SM, Bennett DC, Moss C. Abnormal pigmentation in hypomelanosis of Ito and pigmentary mosaicism: the role of pigmentary genes. *Br J Dermatol*. 2004 Aug;151(2):269-82.
23. Artigas-Pallares J, Gabau-Vila E, Guitart-Feliubadalo M. [Syndromic autism: II. Genetic syndromes associated with autism]. *Rev Neurol*. 2005 Jan 15;40 Suppl 1:S151-62.
24. Sybert VP. Hypomelanosis of Ito: a description, not a diagnosis. *J Invest Dermatol*. 1994 Nov;103(5 Suppl):141S-3S.
25. Baty BJ, Olson SB, Magenis RE, Carey JC. Trisomy 20 mosaicism in two unrelated girls with skin hypopigmentation and normal intellectual development. *Am J Med Genet*. 2001 Mar 15;99(3):210-6.
26. Almeida AS, Cechin WE, Ferraz J, Rodriguez R, Moro A, Jorge R, et al [Hypomelanosis of Ito - case report]. *J Pediatr (Rio J)*. 2001 Jan-Feb;77(1):59-62.
27. Oiso N, Amatsu A, Kawara S, Kawada A. Pigmentary mosaicism with hyperpigmented streaks on the palmoplantar lesion associated with balanced X; autosome translocations t(X; 9)(p11.21; q34.1). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Mar;23(3):359-61.
28. Bolognia JL, Orlow SJ, Glick SA. Lines of Blaschko. *J Am Acad Dermatol*. 1994 Aug;31(2 Pt 1):157-90; quiz 90-2.
29. Taibjee SM, Hall D, Balderson D, Larkins S, Stubbs T, Moss C. Keratinocyte cytogenetics in 10 patients with pigmentary mosaicism: identification of one case of trisomy 20 mosaicism confined to keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*. 2009 Oct;34(7):823-9.
30. Niessen RC, Jonkman MF, Muis N, Hordijk R, van Essen AJ. Pigmentary mosaicism following the lines of Blaschko in a girl with a double aneuploidy mosaicism: (47,XX,+7/45,X). *Am J Med Genet A*. 2005 Sep 1;137A(3):313-22.
31. Happle R. What is a nevus? A proposed definition of a common medical term. *Dermatology*. 1995;191(1):1-5.
32. Kivirikko S, Salonen R, Salo A, von Koskull H. Prenatally detected trisomy 7 mosaicism in a dysmorphic child. *Prenat Diagn*. 2002 Jul;22(7):541-4.
33. Gardner RJ, Dockery HE, Fitzgerald PH, Parfitt RG, Romain DR, Scobie N, et al Mosaicism with a normal cell line and an autosomal structural rearrangement. *J Med Genet*. 1994 Feb;31(2):108-14.

34. Happle R. Lethal genes surviving by mosaicism: a possible explanation for sporadic birth defects involving the skin. *J Am Acad Dermatol*. 1987 Apr;16(4):899-906.
35. Itin P, Burger B. Mosaic manifestations of monogenic skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009 Sep;7(9):744-48.
36. Tagra S, Talwar AK, Walia RL. Lines of Blaschko. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2005 Jan-Feb;71(1):57-9.
37. Happle R. Lyonization and the lines of Blaschko. *Hum Genet*. 1985;70(3):200-6.
38. Happle R. The lines of Blaschko: a developmental pattern visualizing functional X-chromosome mosaicism. *Curr Probl Dermatol*. 1987;17:5-18.
39. Ohashi H, Tsukahara M, Murano I, Naritomi K, Nishioka K, Miyake S, et al Pigmentary dysplasias and chromosomal mosaicism: report of 9 cases. *Am J Med Genet*. 1992 Jul 1;43(4):716-21.
40. Moss C, Larkins S, Stacey M, Blight A, Farndon PA, Davison EV. Epidermal mosaicism and Blaschko's lines. *J Med Genet*. 1993 Sep;30(9):752-5.
41. Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*. 1993 Nov;129(11):1460-70.
42. Happle R. [Back mutation mosaic: a new genetic principle]. *Hautarzt*. 1997 Sep;48(9):613-4.
43. Hamm H. Cutaneous mosaicism of lethal mutations. *Am J Med Genet*. 1999 Aug 6;85(4):342-5.
44. Moss C. Cytogenetic and molecular evidence for cutaneous mosaicism: the ectodermal origin of Blaschko lines. *Am J Med Genet*. 1999 Aug 6;85(4):330-3.
45. Millington GW. Genomic imprinting and dermatological disease. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Sep;31(5):681-8.
46. Happle R, König A. Familial naevus sebaceus may be explained by parandominant transmission. *Br J Dermatol*. 1999 Aug;141(2):377.
47. Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, et al Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A*. 2007 Aug 1;143A(15):1679-86.
48. Pagon RA, Hall JG, Davenport SL, Aase J, Norwood TH, Hoehn HW. Abnormal skin fibroblast cytogenetics in four dysmorphic patients with normal lymphocyte chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1979 Jan;31(1):54-61.
49. Lipsker D, Flory E, Wiesel ML, Hanau D, de la Salle H. Between light and dark, the chimera comes out. *Arch Dermatol*. 2008 Mar;144(3):327-30.
50. Pellegrino JE, Schnur RE, Kline R, Zackai EH, Spinner NB. Mosaic loss of 15q11q13 in a patient with hypomelanosis of Ito: is there a role for the P gene? *Hum Genet*. 1995 Oct;96(4):485-9.
51. Happle R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet*. 1986 Apr;29(4):321-4.
52. Happle R. Cutaneous manifestation of lethal genes. *Hum Genet*. 1986 Mar;72(3):280.

53. Happle R, Barbi G, Eckert D, Kennerknecht I. "Cutis tricolor": congenital hyper- and hypopigmented macules associated with a sporadic multisystem birth defect: an unusual example of twin spotting? *J Med Genet.* 1997 Aug;34(8):676-8.
54. Happle R. Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Aug;41(2 Pt 1):143-64.
55. Robinson DO, Boyd Y, Cockburn D, Collinson MN, Craig I, Jacobs PA. The parental origin of de novo X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy revealed by M27 beta methylation analysis. *Genet Res.* 1990 Oct-Dec;56(2-3):135-40.
56. Gatter N, Hoppe B, Nutzenadel F, Waldherr R, Querfeld U. A cutaneous disease with multisystem involvement: hypomelanosis of Ito may be associated with proteinuria, focal segmental glomerulosclerosis and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jun;22(6):1796-8.
57. Disteche CM. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.* 1995 Jan;11(1):17-22.
58. Miller AP, Willard HF. Chromosomal basis of X chromosome inactivation: identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8709-14.
59. Yatsenko SA, Sahoo T, Rosenkranz M, Mendoza-Londono R, Naeem R, Scaglia F. Attenuated phenotype in a child with trisomy for 1q due to unbalanced X;1 translocation [46,X,der(X),t(X;1)(q28;q32.1)]. *Am J Med Genet A.* 2004 Jul 1;128A(1):72-7.
60. Jorde LB CJ, Bamshad MJ, White RL. . *Genética Médica 3° ed.* ed: Elsevier 2004.
61. Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, et al A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet.* 1999 Jan;104(1):49-55.
62. Capaldi L, Gray J, Abuelo D, Torrelo A, Nieto J, Lapidus C, et al Pigmentary mosaicism and mosaic Turner syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2005 May;52(5):918-9.
63. Pinheiro A, Mathew MC, Thomas M, Jacob M, Srivastava VM, Cherian R, et al The clinical profile of children in India with pigmentary anomalies along the lines of Blaschko and central nervous system manifestations. *Pediatr Dermatol.* 2007 Jan-Feb;24(1):11-7.
64. Shinawi M, Shao L, Jeng LJ, Shaw CA, Patel A, Bacino C, et al Low-level mosaicism of trisomy 14: phenotypic and molecular characterization. *Am J Med Genet A.* 2008 Jun 1;146A(11):1395-405.
65. Hansen LK, Brandrup F, Rasmussen K. Pigmentary mosaicism with mosaic chromosome 5p tetrasomy. *Br J Dermatol.* 2003 Aug;149(2):414-6.
66. Mintz B. Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967 Jul;58(1):344-51.
67. Kayser M, Henderson LB, Kreutzman J, Schreck R, Graham JM, Jr. Blaschkolinear skin pigmentary variation due to trisomy 7 mosaicism. *Am J Med Genet.* 2000 Nov 27;95(3):281-4.
68. Magenis E, Webb MJ, Spears B, Opitz JM. Blaschkolinear malformation syndrome in complex trisomy-7 mosaicism. *Am J Med Genet.* 1999 Dec 22;87(5):375-83.
69. Hansen LK, Bygum A, Krogh LN. Infantile spasms and pigmentary mosaicism. *Epilepsia.* 2009 Dec 22.

70. Ousager LB, Brandrup F, Brasch-Andersen C, Erlendsson A. Skin manifestations in a case of trisomy 16 mosaicism. *Br J Dermatol*. 2006 Jan;154(1):172-6.
71. Findlay G. The genetic mosaic. *J R Soc Med*. 1993 Apr;86(4):212-6.
72. Jackson R. The lines of Blaschko: a review and reconsideration: Observations of the cause of certain unusual linear conditions of the skin. *Br J Dermatol*. 1976 Oct;95(4):349-60.
73. Happle R, Assim A. The lines of Blaschko on the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Apr;44(4):612-5.
74. Huszar D, Sharpe A, Jaenisch R. Migration and proliferation of cultured neural crest cells in W mutant neural crest chimeras. *Development*. 1991 May;112(1):131-41.
75. Sadler YW L. *Embriologia Médica*. 7^{ed} ed. Koogan G, editor 1995.
76. Gupta S, Shah S, McGaw A, Mercado T, Zaslav AL, Tegay D. Trisomy 2 mosaicism in hypomelanosis of Ito. *Am J Med Genet A*. 2007 Oct 15;143A(20):2466-8.
77. Woods CG, Bankier A, Curry J, Sheffield LJ, Slaney SF, Smith K, et al Asymmetry and skin pigmentary anomalies in chromosome mosaicism. *J Med Genet*. 1994 Sep;31(9):694-701.
78. Rivera H, Correa-Cerro LS, Robinson DO, Crolla JA. Functional Xp disomy and hypomelanosis of Ito. *Arch Med Res*. 2000 Jan-Feb;31(1):88-92.
79. Paller AS. Pigmentary patterning as a clinical clue of genetic mosaicism. *Arch Dermatol*. 1996 Oct;132(10):1234-5.
80. GUPTA MG, V. HYPOMELANOSIS OF ITO: A CASE REPORT. *Indian Journal of Psychiatry*. [journal article]. 2002;44(3):4.
81. De Luca M, D'Anna F, Bondanza S, Franzi AT, Cancedda R. Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *J Cell Biol*. 1988 Nov;107(5):1919-26.
82. Buzas JW, Sina B, Burnett JW. Hypomelanosis of Ito. Report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1981 Feb;4(2):195-204.
83. Luiz Carlos Uchôa Junqueira. *Histologia básica - texto e atlas*. 11^a ed. Gen) egkg, editor 2008.
84. Rutland BM, Edgar MA, Horenstein MG. Hypomelanosis of Ito associated with precocious puberty. *Pediatr Neurol*. 2006 Jan;34(1):51-4.
85. Gómez-Lado CE-P, J.; Blanco-Barca O.; del Río-Latorre E.; Fernández-Redondo V.; Castro-Gago M. . Hipomelanosis de Ito. Un síndrome neurocutáneo heterogéneo y posiblemente infradiagnosticado. *REV NEUROL* [journal article]. 2004;38(3):6.
86. Lori L. Olson BLM. *Current Management in Child Neurology*. Third Edition ed 2005.
87. Janniger CM, MS. Hypomelanosis of Ito. *eMedicine Pediatrics: General Medicine*: <http://emedicine.medscape.com/article/909996>; 2010 extraído em maio/2010.
88. Orlow S. Congenital and genetic disorders associated with hypopigmentation. *Dermatol Clin*. 1994;6:5.
89. Haenen I, Vanquickenborne L, Kerre S, Degreef H. Hypomelanosis of Ito. *Dermatology*. 1998;196(4):467-9.
90. Moss C, Burn J. Genetic counselling in hypomelanosis of Ito: case report and review. *Clin Genet*. 1988 Aug;34(2):109-15.

91. Koiffmann CP, de Souza DH, Diamant A, Ventura HB, Alves RS, Kihara S, et al. Incontinentia pigmenti achromians (hypomelanosis of ITO, MIM 146150): further evidence of localization at Xp11. *Am J Med Genet.* 1993 Jun 15;46(5):529-33.
92. Pulimood S, Rajagopalan B, Jacob M, George S, Korah I. Hypomelanosis of Ito with unusual associations. *Clin Exp Dermatol.* 1997 Nov;22(6):295-6.
93. Auriemma A, Agostinis C, Bianchi P, Bellan C, Salvoni L, Manara O, et al. Hemimegalencephaly in hypomelanosis of Ito: early sonographic pattern and peculiar MR findings in a newborn. *Eur J Ultrasound.* 2000 Sep;12(1):61-7.
94. Davalos DB, Merikangas J, Bender S. Psychosis in hypomelanosis of Ito. *J R Soc Med.* 2001 Mar;94(3):140-1.
95. Shobha N, Taly AB, Sinha S, Arunodaya GR, Srikanth SG. Neurological pictures. Hypomelanosis of Ito. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Jul;77(7):873.
96. Chapman K, Cardenas JF. Hemimegalencephaly in a patient with a neurocutaneous syndrome. *Semin Pediatr Neurol.* 2008 Dec;15(4):190-3.
97. Sánchez BM, EL; González, MC; Meléndez, GM. Hipertrichosis localizada y mosaicismo pigmentario tipo Ito (hipomelanosis de Ito). *An Pediatr (Barc).* [Cartas al Editor]. 2008;68(3).
98. Assogba K, Ferlazzo E, Striano P, Calarese T, Villeneuve N, Ivanov I, et al. Heterogeneous seizure manifestations in Hypomelanosis of Ito: report of four new cases and review of the literature. *Neurol Sci.* 2010 Feb;31(1):9-16.
99. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics.* 2004 May;113(5):e472-86.
100. Muhammed K, Mathew J. Coexistence of two neurocutaneous syndromes: tuberous sclerosis and hypomelanosis of Ito. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 Jan-Feb;73(1):43-5.
101. Bakare MO, Ikegwonu NN. Childhood autism in a 13 year old boy with oculocutaneous albinism: a case report. *J Med Case Reports.* 2008;2:56.
102. Cavallari V, Ussia AF, Siragusa M, Schepis C. Hypomelanosis of Ito: electron microscopical observations on two new cases. *J Dermatol Sci.* 1996 Oct;13(1):87-92.
103. Leonard NJ, Tomkins DJ. Diploid/tetraploid/t(1;6) mosaicism in a 17-year-old female with hypomelanosis of Ito, multiple congenital anomalies, and body asymmetry. *Am J Med Genet.* 2002 Sep 15;112(1):86-90.
104. Cellini A, Morroni M, Simonetti O, Offidani A. Hypomelanosis of Ito: a case report with clinical and ultrastructural data. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1998 Jan;10(1):73-6.
105. Vergine G, Mencarelli F, Diomedi-Camassei F, Caridi G, El Hachem M, Ghiggeri GM, et al. Glomerulocystic kidney disease in hypomelanosis of Ito. *Pediatr Nephrol.* 2008 Jul;23(7):1183-7.
106. Keng WT, Harewood L, Grace E, Paxton C, Lam WW, Fitzpatrick DR. A balanced reciprocal translocation in a case of hypomelanosis of Ito with confirmation of mosaicism using buccal cell interphase FISH. *Am J Med Genet A.* 2006 May 15;140(10):1111-3.
107. Glass IA, Swindlehurst CA, Aitken DA, McCrea W, Boyd E. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 2 with normal levels of isocitrate dehydrogenase. *J Med Genet.* 1989 Feb;26(2):127-30.
108. Miller CA, Parker WD, Jr. Hypomelanosis of Ito: association with a chromosomal abnormality. *Neurology.* 1985 Apr;35(4):607-10.

109. Kroisel PM, Petek E, Wagner K. Skin pigmentary anomalies in a mosaic form of partial tetrasomy 3q. *J Med Genet.* 2000 Sep;37(9):723-5.
110. Stanley WS, Powell CM, Devine GC, Ellingham T, Samango-Sprouse CA, Vaught DR, et al Mosaic 5p tetrasomy. *Am J Med Genet.* 1993 Mar 15;45(6):774-6.
111. Bitoun P, Philippe C, Cherif M, Mulcahy MT, Gilgenkrantz S. Incontinentia pigmenti (type 1) and X;5 translocation. *Ann Genet.* 1992;35(1):51-4.
112. Jenkins D, Martin K, Young ID. Hypomelanosis of Ito associated with mosaicism for trisomy 7 and apparent 'pseudomosaicism' at amniocentesis. *J Med Genet.* 1993 Sep;30(9):783-4.
113. DeLozier-Blanchet CD, Guenin R. Cytogenetics of ring chromosome 7. *Clin Genet.* 1984 Jan;25(1):84-5.
114. Akefeldt A, Gillberg C. Hypomelanosis of Ito in three cases with autism and autistic-like conditions. *Dev Med Child Neurol.* 1991 Aug;33(8):737-43.
115. Dereser-Dennl M, Brude E, Konig R. [Hypomelanosis Ito in translocation trisomy 9/mosaicism (46,XX/46,XX,t(9;9)(p24;p24)). Spontaneous remission in childhood]. *Hautarzt.* 2000 Sep;51(9):688-92.
116. Hodgson SV, Neville B, Jones RW, Fear C, Bobrow M. Two cases of X/autosome translocation in females with incontinentia pigmenti. *Hum Genet.* 1985;71(3):231-4.
117. Gilgenkrantz S, Tridon P, Pinel-Briquel N, Beurey J, Weber M. Translocation (X;9)(p11;q34) in a girl with incontinentia pigmenti (IP): implications for the regional assignment of the IP *locus* to Xp11? *Ann Genet.* 1985;28(2):90-2.
118. Toriello HV, Glover TW, Takahara K, Byers PH, Miller DE, Higgins JV, et al A translocation interrupts the COL5A1 gene in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and hypomelanosis of Ito. *Nat Genet.* 1996 Jul;13(3):361-5.
119. Donnai D, McKeown C, Andrews T, Read AP. Diploid/triploid mixoploidy and hypomelanosis of Ito. *Lancet.* 1986 Jun 21;1(8495):1443-4.
120. Boon C, Markello T, Jackson-Cook C, Pandya A. Partial trisomy 10 mosaicism with cutaneous manifestations: report of a case and review of the literature. *Clin Genet.* 1996 Nov;50(5):417-21.
121. Cannizzaro LA, Hecht F. Gene for incontinentia pigmenti maps to band Xp11 with an (X;10) (p11;q22) translocation. *Clin Genet.* 1987 Jul;32(1):66-9.
122. English CJ, Goodship JA, Jackson A, Lowry M, Wolstenholme J. Trisomy 12 mosaicism in a 7 year old girl with dysmorphic features and normal mental development. *J Med Genet.* 1994 Mar;31(3):253-4.
123. Wilson WG, Shires MA, Willson KA, Wyandt HE, Harris LM, Kelly TE. Trisomy 18/trisomy 13 mosaicism in an adult with profound mental retardation and multiple malformations. *Am J Med Genet.* 1983 Sep;16(1):131-6.
124. Correa-Cerro LS, Rivera H, Vasquez AI. Functional Xp disomy and de novo t(X;13)(q10;q10) in a girl with hypomelanosis of Ito. *J Med Genet.* 1997 Feb;34(2):161-3.
125. Kajii T, Tsukahara M, Fukushima Y, Hata A, Matsuo K, Kuroki Y. Translocation (X;13)(p11.21;q12.3) in a girl with incontinentia pigmenti and bilateral retinoblastoma. *Ann Genet.* 1985;28(4):219-23.

126. Johnson VP, Aceto T, Jr., Likness C. Trisomy 14 mosaicism: case report and review. *Am J Med Genet.* 1979;3(4):331-9.
127. Kuwahara RT, Henson T, Tunca Y, Wilroy SW. Hyperpigmentation along the lines of Blaschko with associated chromosome 14 mosaicism. *Pediatr Dermatol.* 2001 Jul-Aug;18(4):360-1.
128. Schmidt R, Eviatar L, Nitowsky HM, Wong M, Miranda S. Ring chromosome 14: a distinct clinical entity. *J Med Genet.* 1981 Aug;18(4):304-7.
129. Tunca Y, Wilroy RS, Kadandale JS, Martens PR, Gunther WM, Tharapel AT. Hypomelanosis of ito and a 'mirror image' whole chromosome duplication resulting in trisomy 14 mosaicism. *Ann Genet.* 2000 Jan-Mar;43(1):39-43.
130. Ishikawa T, Kanayama M, Sugiyama K, Katoh T, Wada Y. Hypomelanosis of Ito associated with benign tumors and chromosomal abnormalities: a neurocutaneous syndrome. *Brain Dev.* 1985;7(1):45-9.
131. Hypomelanosis of Ito and chromosomal mosaicism in fibroblasts. *Lancet.* 1986 Aug 9;2(8502):343.
132. Bernstein R, Dawson B, Kohl R, Jenkins T. X;15 translocation in a retarded girl: X inactivation pattern and attempt to localise the hexosaminidase A and other loci. *J Med Genet.* 1979 Aug;16(4):254-62.
133. Fujimoto A, Lin MS, Korula SR, Wilson MG. Trisomy 14 mosaicism with t(14;15)(q11;p11) in offspring of a balanced translocation carrier mother. *Am J Med Genet.* 1985 Oct;22(2):333-42.
134. Turleau C, Taillard F, Doussau de Bazignan M, Delepine N, Desbois JC, de Grouchy J. Hypomelanosis of Ito (incontinentia pigmenti achromians) and mosaicism for a microdeletion of 15q1. *Hum Genet.* 1986 Oct;74(2):185-7.
135. Neri G, Ricci R, Pelino A, Bova R, Tedeschi B, Serra A. A boy with ring chromosome 15 derived from a t(15q;15q) Robertsonian translocation in the mother: cytogenetic and biochemical findings. *Am J Med Genet.* 1983 Feb;14(2):307-14.
136. Steichen-Gersdorf E, Trawoger R, Duba HC, Mayr U, Felber S, Utermann G. Hypomelanosis of Ito in a girl with plexus papilloma and translocation (X;17). *Hum Genet.* 1993 Feb;90(6):611-3.
137. Crolla JA, Gilgenkrantz S, de Grouchy J, Kajii T, Bobrow M. Incontinentia pigmenti and X-autosome translocations. Non-isotopic in situ hybridization with an X-centromere-specific probe (pSV2X5) reveals a possible X-centromeric breakpoint in one of five published cases. *Hum Genet.* 1989 Feb;81(3):269-72.
138. Zajac V, Kirchhoff T, Levy ER, Horsley SW, Miller A, Steichen-Gersdorf E, et al. Characterisation of X;17(q12;p13) translocation breakpoints in a female patient with hypomelanosis of Ito and choroid plexus papilloma. *Eur J Hum Genet.* 1997 Mar-Apr;5(2):61-8.
139. Chemke J, Rappaport S, Etrog R. Aberrant melanoblast migration associated with trisomy 18 mosaicism. *J Med Genet.* 1983 Apr;20(2):135-7.
140. Chitayat D, Friedman JM, Johnston MM. Hypomelanosis of Ito--a nonspecific marker of somatic mosaicism: report of case with trisomy 18 mosaicism. *Am J Med Genet.* 1990 Mar;35(3):422-4.

141. Murano I, Ohashi H, Tsukahara M, Tonoki H, Okino F, Atsumi M, et al Pigmentary dysplasias in long survivors with mosaic trisomy 18: report of two cases. Clin Genet. 1991 Jan;39(1):68-74.
142. Uehara S, Obara Y, Obara T, Funato T, Yaegashi N, Fukaya T, et al Trisomy 18 mosaicism associated with secondary amenorrhea: ratios of mosaicism in different samples and complications. Clin Genet. 1996 Feb;49(2):91-4.
143. Devriendt K, Matthijs G, Meireleire J, Roelen L, van Buggenhout G, Fryns JP. Skin pigment anomalies and mosaicism for a double autosomal trisomy (48,XX,+18,+20). Genet Couns. 1998;9(4):283-6.
144. Ukita M, Hasegawa M, Nakahori T. Trisomy 18 mosaicism in a woman with normal intelligence, pigmentary dysplasia, and an 18 trisomic daughter. Am J Med Genet. 1997 Jan 20;68(2):240-1.
145. Grazia R, Tullini A, Rossi PG, Neri I, Patrizi A, Croci G, et al Hypomelanosis of Ito with trisomy 18 mosaicism. Am J Med Genet. 1993 Jan 1;45(1):120-1.
146. Atnip RL, Summitt RL. Tetraploidy and 18-trisomy in a six-year-old triple mosaic boy. Cytogenetics. 1971;10(5):305-17.
147. Lungarotti MS, Martello C, Calabro A, Baldari F, Mariotti G. Hypomelanosis of Ito associated with chromosomal translocation involving Xp11. Am J Med Genet. 1991 Sep 15;40(4):447-8.
148. Lacour, JPP; Aberdam, E.;Chiaverini, C.; Turc-Carel, C.; Ortonne, J.P.; Balotti, R. Cytogenetic and functional studies of melanocytes in pigmentary mosaicism of the Ito type: preliminary results. British Journal of Dermatology 2003 149(Suppl. 64).
149. Hermesen MA, Tijssen M, Acero IH, Meijer GA, Ylstra B, Toral JF. High resolution microarray CGH and MLPA analysis for improved genotype/phenotype evaluation of two childhood genetic disorder cases: ring chromosome 19 and partial duplication 2q. Eur J Med Genet. 2005 Jul-Sep;48(3):310-8.
150. Ensenauer RE, Shaughnessy WJ, Jalal SM, Dawson DB, Courteau LK, Ellison JW. Trisomy 20 mosaicism caused by a maternal meiosis II error is associated with normal intellect but multiple congenital anomalies. Am J Med Genet A. 2005 Apr 15;134A(2):202-6.
151. Crowe CA, Schwartz S, Black CJ, Jaswaney V. Mosaic trisomy 22: a case presentation and literature review of trisomy 22 phenotypes. Am J Med Genet. 1997 Sep 5;71(4):406-13.
152. Fritz B, Kuster W, Orstavik KH, Naumova A, Spranger J, Rehder H. Pigmentary mosaicism in hypomelanosis of Ito. Further evidence for functional disomy of Xp. Hum Genet. 1998 Oct;103(4):441-9.
153. de Grouchy J, Turleau C, Doussau de Bazignan M, Maroteaux P, Thibaud D. Incontinentia pigmenti (IP) and r(X). Tentative mapping of the IP *locus* to the X juxtacentromeric region. Ann Genet. 1985;28(2):86-9.
154. Dennis NR, Collins AL, Crolla JA, Cockwell AE, Fisher AM, Jacobs PA. Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. J Med Genet. 1993 Jun;30(6):482-6.
155. Rott HD. Extracutaneous analogies of Blaschko lines. Am J Med Genet. 1999 Aug 6;85(4):338-41.
156. Happle R. Tentative assignment of hypomelanosis of Ito to 9q33----qter. Hum Genet. 1987 Jan;75(1):98-9.

157. Sefiani A, Heuertz S, Turleau C, Thibaud D, de Grouchy J, Hors-Cayla MC. Incontinentia pigmenti: Xp breakpoint is not the same in a case of r(X) and in X/autosome translocations. *Ann Genet.* 1989;32(3):149-51.
158. Vormittag W, Ensinger C, Raff M. Cytogenetic and dermatoglyphic findings in a familial case of hypomelanosis of Ito (incontinentia pigmenti achromians). *Clin Genet.* 1992 Jun;41(6):309-14.
159. Lenzini E, Bertoli P, Artifoni L, Battistella PA, Baccichetti C, Peserico A. Hypomelanosis of Ito: involvement of chromosome aberrations in this syndrome. *Ann Genet.* 1991;34(1):30-2.
160. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, et al Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A.* 2006 Dec 15;140(24):2757-67.
161. Ruggieri M. Familial hypomelanosis of ito: implications for genetic counselling. *Am J Med Genet.* 2000 Nov 6;95(1):82-4.
162. Amon M, Menapace R, Kirnbauer R. Ocular symptomatology in familial hypomelanosis Ito. *Incontinentia pigmenti achromians. Ophthalmologica.* 1990;200(1):1-6.
163. Zappella M. Autism and hypomelanosis of Ito in twins. *Dev Med Child Neurol.* 1993 Sep;35(9):826-32.
164. Kalter DC, Griffiths WA, Atherton DJ. Linear and whorled nevoid hypermelanosis. *J Am Acad Dermatol.* 1988 Dec;19(6):1037-44.
165. Hartmann A, Hofmann UB, Hoehn H, Broecker EB, Hamm H. Postnatal confirmation of prenatally diagnosed trisomy 20 mosaicism in a patient with linear and whorled nevoid hypermelanosis. *Pediatr Dermatol.* 2004 Nov-Dec;21(6):636-41.
166. Sridhar JN, S; Desylva,PLK Hypomelanosis of ITO. *MJAFI.* [case report]. 2006;62:2.
167. Happle R. Incontinentia pigmenti versus hypomelanosis of Ito: the whys and wherefores of a confusing issue. *Am J Med Genet.* 1998 Aug 27;79(1):64-5.
168. Gonzalez-Ensenat MA, Vicente A, Poo P, Catala V, Mar Perez-Iribarne M, Fuster C, et al Phylloid hypomelanosis and mosaic partial trisomy 13: two cases that provide further evidence of a distinct clinicogenetic entity. *Arch Dermatol.* 2009 May;145(5):576-8.
169. Happle R. Phylloid hypermelanosis: an unusual form of pigmentary mosaicism. *Dermatology.* 2010;220(2):183-5.
170. Kaya TI, Kokturk A, Nayci A, Aksoyek S, Dusmez D. Hypomelanosis of Ito with ileal atresia. *Int J Dermatol.* 2001 Nov;40(11):722-4.
171. Yakinci C, Kutlu NO, Alp MN, Senol M, Durmaz Y, Budak T. Hypomelanosis of ito with trisomy 13 mosaicism [46, XY, der (13;13) (q10;q10), +13/46,xy]. *Turk J Pediatr.* 2002 Apr-Jun;44(2):152-5.
172. Baba M, Seckin D, Akcali C, Happle R. Familial cutis tricolor: a possible example of paradominant inheritance. *Eur J Dermatol.* 2003 Jul-Aug;13(4):343-5.
173. Souto LR, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MH, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J.* 2006 Mar 2;124(2):71-6.
174. Halaban R, Pomerantz SH, Marshall S, Lambert DT, Lerner AB. Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture. *J Cell Biol.* 1983 Aug;97(2):480-8.

175. Hu DN, McCormick SA, Seedor JA, Ritterband DC, Shah MK. Isolation, purification and cultivation of conjunctival melanocytes. *Exp Eye Res.* 2007 Apr;84(4):655-62.
176. Cowan JH, R; Francke, U. Cytogenetic Analysis of Melanocytes From Premalignant Nevi and Melanomas. *Journal of the National Cancer Institute.* 1988; 80(14).
177. Sanchez O EJ, Yunis JJ. A simple G banding technique. *Lancet.* 1973;2.
178. Verma RaB, A. Human chromosomes. 1° ed: pergamon press; 1989.
179. Moorhead PS NP, Mellman WJ, Batups MM, Hengeford DA. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp cell res.* 1960;20:613-6.
180. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961 Apr 22;190:372-3.
181. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet.* 1962 Jun;14:135-48.
182. B Dutrillaux CL, J Couturier, Lejeune Coloration par l'acridine orange de chromosomes préalablement traités par le 5-bromodeoxyuridine (BUdR). *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1973;276:3179-81.
183. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
184. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1261-70.
185. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet.* 2004 Apr;41(4):241-8.
186. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, et al Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* 2006 Aug;43(8):625-33.
187. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, et al Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr.* 2006 Jul;149(1):98-102.
188. Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, et al Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One.* 2007;2(3):e327.
189. Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, Madan-Khetarpal S, Surti U, Jackson KE, et al Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9):1071-3.
190. Bondanza S, Maurelli R, Paterna P, Migliore E, Giacomo FD, Primavera G, et al Keratinocyte cultures from involved skin in vitiligo patients show an impaired in vitro behaviour. *Pigment Cell Res.* 2007 Aug;20(4):288-300.
191. Czajkowski R, Placek W, Drewa T, Olszewska-Slonina D, Sir J, Kowaliszyn B, et al Establishing melanocyte cultures in a serum-free system for transplantation in vitiligo patients. *Med Sci Monit.* 2006 Feb;12(2):CR63-9.

192. Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Mar;79(6):2018-22.
193. Bandyopadhyay D, Timchenko N, Suwa T, Hornsby PJ, Campisi J, Medrano EE. The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Exp Gerontol*. 2001 Aug;36(8):1265-75.
194. Abdel-Naser MB. Mitogen requirements of normal epidermal human melanocytes in a serum and tumor promoter free medium. *Eur J Dermatol*. 2003 Jan-Feb;13(1):29-33.
195. Vust A, Riordan D, Wickstrom D, Chudley AE, Dawson AJ. Functional mosaic trisomy of 1q12-->1q21 resulting from X-autosome insertion translocation with random inactivation. *Clin Genet*. 1998 Jul;54(1):70-3.
196. Wolff , DJ, Schwartz, S, Montgomery, T, Zackowski, JL. Random X inactivation in a girl with a balanced t(X;9) and an abnormal phenotype. *Am J Med Genet*. 1998 Jun 5;77(5):401-4.
197. Hellkuhl B, de la Chapelle A, Grzeschik KH. Different patterns of X chromosome inactivity in lymphocytes and fibroblasts of a human balanced X;autosome translocation. *Hum Genet*. 1982;60(2):126-9.
198. Filippi G, Pecile V, Archidiacono N, Baragino E, Auber G, Rocchi M. X chromosome replication patterns in a case of X;9 balanced translocation. *J Med Genet*. 1983 Dec;20(6):467-8.
199. Smith NM, Fernandez H, Chambers HM, Callen DF. Necropsy findings in a fetus with a 46,XY,dic t(X;21)(p11.1;p11.1). *J Med Genet*. 1992 Jul;29(7):503-6.
200. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, et al The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet*. 2005 Jan;42(1):8-16.
201. Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, et al Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet*. 2008 Apr;82(4):927-36.
202. Zou YS, Milunsky JM. Developmental disability and hypomelanosis of Ito in a female with 7.3 Mb de novo duplication of Xp11.3-p11.4 and random X inactivation. *Am J Med Genet A*. 2009 Nov;149A(11):2573-7.
203. Lossi AM, Laugier-Anfossi F, Depetris D, Gecz J, Gedeon A, Kooy F, et al Abnormal expression of the KLF8 (ZNF741) gene in a female patient with an X;autosome translocation t(X;21)(p11.2;q22.3) and non-syndromic mental retardation. *J Med Genet*. 2002 Feb;39(2):113-7.
204. Schluth C, Cossee M, Girard-Lemaire F, Carelle N, Dollfus H, Jeandidier E, et al Phenotype in X chromosome rearrangements: pitfalls of X inactivation study. *Pathol Biol (Paris)*. 2007 Feb;55(1):29-36.
205. Tommerup N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet*. 1993 Sep;30(9):713-27.
206. Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, et al X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet*. 2006 Sep;79(3):493-9.
207. Duba HC, Doll A, Neyer M, Erdel M, Mann C, Hammerer I, et al The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2002 Jun;10(6):351-61.

208. Fantès J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, et al Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet.* 2003 Apr;33(4):461-3.
209. Shanske AL, Edelmann L, Kardon NB, Gosset P, Levy B. Detection of an interstitial deletion of 2q21-22 by high resolution comparative genomic hybridization in a child with multiple congenital anomalies and an apparent balanced translocation. *Am J Med Genet A.* 2004 Nov 15;131(1):29-35.
210. Rogers RC, Stevenson RE, Simensen RJ, Holden KR, Schwartz CE. Finding new etiologies of mental retardation and hypotonia: X marks the spot. *Dev Med Child Neurol.* 2008 Feb;50(2):104-11.
211. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet.* 2008 Apr;16(4):422-34.
212. Denayer E, Brems H, de Cock P, Evans GD, Van Calenbergh F, Bowers N, et al Pathogenesis of vestibular schwannoma in ring chromosome 22. *BMC Med Genet.* 2009;10:97.
213. Jeffries AR, Curran S, Elmslie F, Sharma A, Wenger S, Hummel M, et al Molecular and phenotypic characterization of ring chromosome 22. *Am J Med Genet A.* 2005 Aug 30;137(2):139-47.
214. Sodre CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, et al Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res.* 2010;9(1):134-43.
215. Kosztolanyi G. Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet.* 1987 Feb;75(2):174-9.
216. MacLean JE, Teshima IE, Szatmari P, Nowaczyk MJ. Ring chromosome 22 and autism: report and review. *Am J Med Genet.* 2000 Feb 28;90(5):382-5.
217. Delcan J, Orera M, Linares R, Saavedra D, Palomar A. A case of ring chromosome 22 with deletion of the 22q13.3 region associated with agenesis of the corpus callosum, fornix and septum pellucidum. *Prenat Diagn.* 2004 Aug;24(8):635-7.
218. Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, et al Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J Med Genet.* 2003 Sep;40(9):690-6.
219. Phelan MC. Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:14.
220. Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z, Bader PI, et al 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet A.* 2010 Mar;152A(3):573-81.
221. Ishmael HA, Cataldi D, Begleiter ML, Pasztor LM, Dasouki MJ, Butler MG. Five new subjects with ring chromosome 22. *Clin Genet.* 2003 May;63(5):410-4.
222. Battini R, Battaglia A, Bertini V, Cioni G, Parrini B, Rapalini E, et al Characterization of the phenotype and definition of the deletion in a new patient with ring chromosome 22. *Am J Med Genet A.* 2004 Oct 1;130A(2):196-9.
223. Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW, Geraghty MT. Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet.* 1999 Dec 22;87(5):384-90.

224. Jobanputra V, Ash E, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Levy B. Changes in an inherited ring (22) due to meiotic recombination? Implications for genetic counseling. *Am J Med Genet A*. 2009 Jun;149A(6):1310-4.
225. Maitz S, Gentilin B, Colli AM, Rizzuti T, Brandolisio E, Vetro A, et al Expanding the phenotype of 22q13.3 deletion: report of a case detected prenatally. *Prenat Diagn*. 2008 Oct;28(10):978-80.
226. Tsukino R, Tsuda N, Dezawa T, Ishii T, Koike M. Ring chromosome 10:46,XX,r(10)(p15 leads to q26). *J Med Genet*. 1980 Apr;17(2):148-50.
227. Riley SB, Buckton KE, Ratcliffe SG, Syme J. Inheritance of a ring 14 chromosome. *J Med Genet*. 1981 Jun;18(3):209-13.
228. Kosztolanyi G. Decreased cell viability of fibroblasts from two patients with a ring chromosome: an in vitro reflection of growth failure? *Am J Med Genet*. 1987 Sep;28(1):181-4.
229. Murthy SK, Malhotra AK, Jacob PS, Naveed S, Al-Rowaished EE, Mani S, et al Analphoid supernumerary marker chromosome characterized by aCGH and FISH as inv dup(3)(q25.33qter) de novo in a child with dysmorphic features and streaky pigmentation: case report. *Mol Cytogenet*. 2008;1:19.
230. Crolla JA, Long F, Rivera H, Dennis NR. FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases. *Am J Med Genet*. 1998 Feb 3;75(4):355-66.
231. Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet*. 1985;69(4):353-70.
232. Viersbach R, Engels H, Gamberdinger U, Hansmann M. Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet*. 1998 Apr 1;76(4):351-8.
233. Crolla JA. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet*. 1998 Feb 3;75(4):367-81.
234. Daniel A, Malafiej P, Preece K, Chia N, Nelson J, Smith M. Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am J Med Genet*. 1994 Oct 15;53(1):8-18.
235. Slavotinek A, Poyser L, Wallace A, Martin F, Gaunt L, Kingston H. Two unique patients with trisomy 18 mosaicism and molecular marker studies. *Am J Med Genet A*. 2003 Mar 15;117A(3):282-8.
236. Bass HN, Fox M, Wulfsberg E, Sparkes RS, Crandall BF. Trisomy 18 mosaicism: clues to the diagnosis. *Clin Genet*. 1982 Dec;22(6):327-30.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1. Parecer do comitê de ética em pesquisa/FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 08/11/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 751/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0542.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “CULTURA E ANÁLISE CITOGENÉTICA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS EM INDIVÍDUOS COM MOSAICO PIGMENTAR TIPO ITO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Karina Soares Cunha

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas / Unicamp

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/10/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Identificar alterações cromossômicas encontradas nos indivíduos portadores de Mosaico pigmentar do tipo Ito associada ou não a retardo mental.

III - SUMÁRIO

Trata-se de estudo descritivo de corte transversal de avaliação de alterações cromossômicas em grupo de 15 indivíduos com retardo mental ou não que apresentam hipomelanbose de Ito de ambos os sexos selecionados no HC da Unicamp. Estudo será feito em amostras de sangue retiradas desses indivíduos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após adequação de pendências, o projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.

Profa. Dra. *Carmen* Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2. Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “CULTURA E ANÁLISE CITOGENÉTICA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS EM INDIVÍDUOS COM MOSAICO PIGMENTAR TIPO ITO”

Responsáveis: Karina Soares Cunha e Dr. Carlos Eduardo Steiner

Eu entendo que eu/o(a) menor sob minha responsabilidade fui/foi convidado a participar em um Projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Hipomelanose de Ito. O objetivo geral do estudo é verificar as possíveis alterações nos cromossomos em diferentes tipos de células.

Se concordar em participar desse estudo será coletada uma amostra de sangue venoso (3mL, o equivalente a uma colher de sobremesa) e realizado biópsia de pele na região interna do antebraço ou região dorsal (retirada de 2 a 4 mm de duas regiões distintas da pele, menor que o tamanho do fundo de uma caneta esferográfica comum). Os procedimentos serão realizados por profissional treinado e habilitado para realizar o procedimento.

Os possíveis riscos associados ao procedimento incluem, para a coleta de sangue periférico, dor no momento da coleta e manchas roxas (equimoses) no local. A biópsia de pele é procedimento médico e será realizada pelo médico geneticista. Para esse procedimento os possíveis riscos são dor, desconforto, irritação e inflamação local. O procedimento será realizado com anestesia local, assepsia e medicação, se necessário.

A vantagem que poderei ter é a caracterização possível esclarecimento da alteração genética encontrada na doença. Se for detectada alguma alteração serei comunicado (a) e informado(a) pelo médico responsável, o qual poderá fornecer aconselhamento genético se eu assim o desejar.

Eu entendo que todas as informações médicas e os resultados dos testes genéticos são sigilosos, logo será utilizado um código para identificação dos participantes. Se os resultados forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será divulgado. A coleta das amostras será realizada em consulta na Unicamp e não haverá gastos extras com os procedimentos. Essas amostras serão utilizadas apenas para essa pesquisa e serão destruídas após sua conclusão.

A minha participação é voluntária e posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação a qualquer momento (incluindo a coleta das amostras) sem comprometer os cuidados médicos recebidos.

Em caso de recurso ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (19) 3521-8936. Outras dúvidas poderão ser esclarecidas após contato com o Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner pelo telefone (19) 3521-8907.

Eu confirmo que li e/ou me foi explicado o conteúdo desse formulário de consentimento e os objetivos da pesquisa. Compreendi seu conteúdo, os procedimentos que serão realizados e os riscos deles decorrentes e estou de acordo em participar desse estudo.

Nome: _____ DGM: _____

Nome e RG do responsável legal

Assinatura do responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos necessários e os possíveis riscos que possam decorrer do estudo; de forma clara e me certificando de seu entendimento. O responsável legal pelo sujeito receberá uma cópia desse formulário de consentimento.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

Anexo 3. Dados clínicos dos indivíduos deste estudo

Caso	etnia	sexo	Idade	Dados clínicos/exame físico	Antecedentes familiares
1	B	F	5	Cardiopatia congênita (CIV, CIA, PCA), fossa frontal com retração bitemporal, fenda palpebral oblíqua, clinobraquidactilia 5° + camptodactilia 3-5°, assimetria de MMII e face (D<E), microstomia, fôvea coccígea, microtia, manchas lineares hipopigmentadas em MM e difusas no tronco, hiperpigmentação no abdômen	Pai: epilepsia + déficit cognitivo
2	P	F	15	RDNPM, escoliose, convulsões, manchas hipopigmentadas em região lombar seguindo as linhas de Blaschko	Aborto espontâneo anterior
3	B	M	14	Atraso motor, cúbito valgo, hemimegalencefalia D, manchas hipo e hiperpigmentadas em HT e HA esquerdos em linhas de Blaschko, até linha média posterior	--
4	P	F	8	RDNPM, dismorfismo facial, coriorretinite, baixa implantação de cabelos, occipital proeminente, hipoplasia malar, ptose palpebral bilateral, estrabismo, sobrancelhas arqueadas, nariz com ponta levemente bífida, cúbito valgo. Manchas hipocrômicas em dorso e face, e com padrão linear em MMSS e II	tios: dificuldade de aprendizado, irmãos: megacólon congênito Consangüinidade dupla
5	B	M	26	RDNPM, epilepsia criptogênica, heterocromia de íris, palato alto, mancha hiperocrômica e hipocrômica de aspecto mosqueado em antebraço E, ombro e dorso até a nádega E, mais evidente na infância, hemiparesia D, paralisia facial, hipotonia, atrofia cerebelar e de córtex, assimetria facial, macrocefalia, acrocefalia, DM moderada a grave.	

Caso	etnia	sexo	Idade	Dados clínicos/exame físico	Antecedentes familiares
6	B	F	15	RDNPM, assimetria de mandíbula, hipertelorismo, esclerótica azulada, assimetria MMII, palato ogival, má oclusão dentária, escoliose, braquidactilia, sindactilia (2° e 3°), cúbito valgo, hipoplasia dedos, hálux alargado, sulco longitudinal, hipotonia, manchas hiperocrômicas e hipocrômicas de aspecto mosqueado em tronco e membros.	Casal consangüíneo, primo materno 2º grau com RDNPM
7	P	F	22	RDNPM, epilepsia, palato alto, hipoplasia de metacarpianos, prega palmar única, sindactilia, unhas hipoplásicas, manchas hipocrômicas em linhas em MMII, tronco e abdômen	
8	B	F	7	RDNPM, atraso na fala, hipoplasia de falanges distais 2° e 3° pododáctilo E, hipoplasia ungueal, tecido subcutâneo abundante. Hiper e hipopigmentação em linhas de Blaschko em membros e dorso	
9	P	F	6	RDNPM, retinoblastoma intraocular E, epilepsia, discreta hidrocefalia supra, hipertelorismo, pregas epicânticas, má oclusão dentária, clinodactilia, prega palmar única, manchas hipocrômicas lineares na face dorsal dos MMSS.	Pai, avô e tios paternos: polidactilia pós-axial
10	B	F	4	RDNPM, cardiopatia congênita (CIA de grande RH com HP leve), palato alto, dificuldade de fala, hirsutismo, hipertireóide, baixa implantação dos cabelos, manchas hiperocrômicas em face, tronco e membros em estrias.	Tia materna com cardiopatia congênita
11	P	F	4	RDNPM, Sinusopatia (TC de crânio), manchas hipopigmentadas irregulares em hemiabdomen E até MSE e dorso, respeitando a linha média. Manchas café com leite em dorso.	Tio Pat. RDNPM + manchas Meio tio mat. Manchas e agressividade

Caso	etnia	sexo	Idade	Dados clínicos/exame físico	Antecedentes familiares
12	B	F	4/5	RDNPM, disfasia, cardiopatia congênita, hérnia umbilical, palato alto, cúbito valgo, hipoplasia de metacarpos e metatarsos, distância intermamilar aumentada, hirsutismo, hipertricrose, baixa implantação das orelhas, Manchas hiperocrômicas em face, tronco e membros. Estrias de hipopigmentação	Tia mat. Cardiopatia congênita
13	P	F	3 m	Cardiopatia congênita (CIA+CIV), hipotonia, Proeminência de osso frontal, retração bitemporal, retrognatía, comissuras bucais para baixo, palato alto, excesso de pele na nuca, clinodactilia bilateral(5°), camptodactilia bilateral (3°,4° e 5°), sindactilia (2° e 5°), mamilos hipopigmentados, hipopigmentação seguindo as linhas de Blaschko em abdômen, dorso e MMII	
14	P	M	1,5	RDNPM, sopro+CIA, sinofre, microstomia, camptodactilia, hemiatrofia cerebral, hemangioma em face anterior de coxa E, Manchas hiperpigmentadas em hemitórax e hemiabdomen E, respeitando a linha média, com áreas de hipopigmentação nessa região, em rodadoinhos extendendo-se ao dorso e MIE	
15	B	B	18	RDNPM, Crises convulsivas, Autismo. Manchas café com leite e hipocromia em abdômen, axila D, fossa ilíaca E, coxa D	Primo mat: DM, Prima mat: def visual

Legenda: Etnia: Pardo (P), Branco (B); Sexo: Feminino (F), Masculino (M); RDNPM: retardo no desenvolvimento neuropsicomotor; DM: deficiência mental; CIA: comunicação interatrial; CIV: comunicação interventricular; PCA: persistência do canal atrial; MM: membros; MMI: membros inferiores; MMSS: membros superiores; D: direita; E: esquerda; HT: hemitórax; HAE: hemiabdomen esquerdo; DM: deficiência mental.