Aline Cristina Zandoná Teixeira

**Estudo genético-clínico e molecular em pacientes portadores de
manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento
neuropsicomotor e/ou malformações**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: **Pediatria**

Orientadora: **Dra. Chong Ae Kim**

São Paulo

2013

Aline Cristina Zandoná Teixeira

**Estudo genético-clínico e molecular em pacientes portadores de
manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento
neuropsicomotor e/ou malformações**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: **Pediatria**

Orientadora: **Dra. Chong Ae Kim**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zandoná-Teixeira, Aline Cristina

Estudo genético-clínico e molecular em pacientes portadores de manchas
cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou
malformações / Aline Cristina Zandoná Teixeira. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Nevo 2.Malformações 3.Técnicas de cultura de células
4.Fibroblastos 5.Citogenética

USP/FM/DBD-287/13

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro:

FAPESP 2011/16664-0 e CNPq 401910/2010-5

*Dedico este trabalho à minha mãe, minha vida,
pela total cumplicidade, ternura, carinho e
amor que me proporcionou condições para
que eu possa ser o que sou.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente à minha querida Mãe, meus irmãos Jú e Rafa, minha tia Ondina, meu primo Dan e minha prima Coca, pela confiança em mim, pela aposta no meu futuro, pela enorme ajuda emocional e por estarem ao meu lado sempre, independente de tudo e, sobretudo, por acreditarem incondicionalmente em mim!

À FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional.

À Dra. Chong Ae Kim pela orientação, confiança, incentivo e ensinamentos sempre! Obrigada pelas palavras ditas, por sempre entender o lado “humano” das pessoas e ser tão compreensiva... Obrigada por perceber nossos problemas e ajudar sempre, sem julgamentos. Obrigada por ser essa pessoa tão boa e generosa, por acreditar em mim e, claro, obrigada pelo seu coração imenso e sua alma tão iluminada!

À Dra. Leslie Domenici Kulikowski pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pela enorme paciência e amizade em todos os momentos. Obrigada pelas palavras de incentivo, por confiar, por sempre apoiar e acolher todos os seus alunos. Obrigada pela sua generosidade, por fazer a gente crescer sempre e buscar cada vez mais. É um orgulho poder fazer parte do seu grupo!

Aos meus amigos citogenômicos e companheiros de laboratório por tudo, principalmente pela amizade e pelas experiências trocadas. Obrigada Máh, pela sua amizade, incontestável, pela sua ajuda direta em tudo, pelas risadas que sempre demos, inclusive por rirmos das mesmas coisas várias vezes como se fosse a primeira vez. Ao Gil, pela astúcia, pela troca de conhecimentos e por, às vezes, não dizer nada, mas entender tudo. Ao Alê, por sempre estar disposto a transmitir seus conhecimentos e ajudar a gente a “pôr a mão na massa”. À Mari, Kerol, Éve, Rô, Flávia, Amon por sempre ajudarem nas pequenas e nas grandes coisas e sempre estarem dispostos. Tenho um carinho especial

por cada um. Todos vocês têm enorme contribuição nesse trabalho! Obrigada de coração, sem vocês não seria possível!

À Fernanda, técnica do LIM 36, pela sua ajuda desde o princípio, pela sua atenção, sempre tornando as coisas mais leves... obrigada pelo apoio e pela amizade. Agradeço também à todos do LIM 36.

À Dra. Larissa S. A. Costa, aos médicos da genética e toda equipe de genética do ICr que é uma equipe única!

À Dra. Mirian Yumie Nishi, por abrir as portas do seu laboratório e ser tão prestativa.

À Dra. Angela Maria Vianna Morgante e todos do seu laboratório.

Aos inúmeros professores que tive em toda minha trajetória acadêmica, que contribuíram das mais diversas maneiras para minha formação.

Aos meus amigos, pelos momentos inexplicáveis que fizeram e fazem com que minha vida seja mais feliz, amável e prazerosa. Obrigada por entenderem minha ausência e por sempre acreditarem e me darem forças em tudo.

Aos pacientes e familiares por permitirem a realização deste trabalho.

E, claro, à Deus por sempre iluminar o meu caminho!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas
pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

*"Os fatos são sonoros, mas entre os fatos há um sussurro.
É o sussurro que me impressiona." (Clarice Lispector)*

*“O que se abatera sobre ela não era um fardo, mas a
insustentável leveza do ser.” (Milan Kundera)*

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Mosaicismo.....	25
1.2 Mosaicismo pigmentar.....	29
1.3 Doenças associadas a manchas pigmentares e mosaicismo.....	33
1.3.1 Síndrome de Pallister-Killian.....	33
1.3.2 Síndrome McCune-Albright.....	34
1.3.3 Hipomelanose de Ito.....	35
1.3.4 Hiperqueratose epidermolítica.....	36
1.3.5 Incontinência Pigmentar.....	37
1.3.6 Mosaicismo do cromossomo 13.....	38
1.4 Justificativa.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
3 METODOLOGIA.....	43
3.1 Casuística.....	43

3.2 Avaliação Clínica.....	43
3.3 Citogenética clássica e molecular de fibroblastos a partir de biópsia cutânea.....	44
3.3.1 Citogenética clássica de fibroblastos.....	44
3.3.2 Coloração por bandamento G.....	47
3.3.3 Análise cromossômica sob bandamento G.....	48
3.3.4 Citogenética molecular de fibroblastos.....	49
3.3.4.1 FISH.....	49
3.3.4.2 MLPA.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 Descrição dos casos com resultados alterados.....	56
4.1.1 Caso I.....	56
4.1.2 Caso II.....	58
4.1.3 Caso III.....	60
4.1.4 Caso IV.....	62
4.1.5 Caso V.....	63
4.1.6 Caso VI.....	65
4.1.7 Caso VII.....	68
4.1.8 Caso VIII.....	69
4.1.9 Caso IX.....	71
Discussão da Síndrome de Pallister-Killian.....	72
4.2 Descrição dos casos sem definição diagnóstica.....	76

4.2.1 Caso X.....	76
Relato de casos sem definição diagnóstica.....	78
4.2.2 Caso XI.....	78
4.2.3 Caso XII.....	80
4.2.4 Caso XIII.....	81
4.2.5 Caso XIV.....	83
4.2.6 Caso XV.....	85
Discussão dos casos sem definição diagnóstica.....	87
5 CONCLUSÕES.....	90
6 REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Demonstração esquemática de como uma mutação pode acarretar em uma população de células mutantes após subseqüentes divisões mitóticas.....	27
Figura 2- Padrões de comprometimento do mosaicismo pigmentar. A. Linhas de Blaschko; B. Padrão em xadrez; C. Padrão filóide; D. Padrão irregular sem separação na linha media.....	29
Figura 3- Migração ectodérmica e teoria para o desenvolvimento de linhas de Blaschko. As células derivadas da crista neural migram transversalmente ao longo de diferentes caminhos dorso- ventrais do desenvolvimento do embrião. O crescimento longitudinal e a flexão do embrião contribuem para o padrão conhecido como linhas de Blaschko.....	30
Figura 4- Reprodução mostrando as linhas de Blaschko aonde na parte de trás, basicamente, há uma forma de V, e na parte da frente, sobre o abdômen, o padrão é em forma de S. Já no couro cabeludo, as linhas são em espiral.....	31
Figura 5- Exemplo de lavagem do tecido na placa de <i>petri</i> estéril.....	45
Figura 6- Exemplo de fragmentação do tecido em partes pequenas.....	45
Figura 7- Exemplo da proliferação celular na linhagem dos fibroblastos.....	46
Figura 8- Heredograma do propósito I.....	56
Figura 9- Características clínicas da paciente destacando assimetria facial, macroglossia, membros assimétricos e manchas cutâneas.....	57

Figura 10- Heredograma do propósito II.....	58
Figura 11- Heredograma do propósito III.....	60
Figura 12- Características clínicas do paciente destacando hipertelorismo, base nasal achatada, lábio superior fino e hérnia inguinoescrotal.....	61
Figura 13- Heredograma do propósito IV.....	62
Figura 14- Heredograma do propósito V.....	63
Figura 15- Heredograma do propósito VI.....	65
Figura 16- Características clínicas da paciente destacando hipertelorismo, fissuras palpebrais, sobrancelhas esparsas, macroglossia e estrias hipopigmentares.....	66
Figura 17- Cariograma da paciente mostrando o isocromossomo 12p.....	67
Figura 18- Análise FISH de célula da mancha hipocrômica, utilizando sonda subtelomérica de 12p. Quatro sinais vermelhos puderam ser detectados, apontando para a tetrassomia 12p.....	67
Figura 19- Heredograma do propósito VII.....	68
Figura 20- Heredograma do propósito VIII.....	69
Figura 21- Características clínicas do paciente destacando alopecia temporal, hipertelorismo, testa proeminente, filtro longo, sobrancelhas esparsas e manchas hiperocrômicas lineares nos membros.....	70
Figura 22- Heredograma do propósito IX.....	71
Figura 23- Características clínicas do paciente destacando fronte ampla, sobrancelhas arqueadas e ralas, filtro longo.....	72
Figura 24- Heredograma do propósito X.....	76

Figura 25- Heredograma do propósito XI.....	78
Figura 26- Características clínicas da paciente destacando fácies grosseiro.....	79
Figura 27- Heredograma do propósito XII.....	80
Figura 28- Heredograma do propósito XIII.....	81
Figura 29- Características clínicas da paciente destacando filtro longo com lábio superior fino e nariz bulboso.....	82
Figura 30- Heredograma do propósito XIV.....	83
Figura 31- Características clínicas da paciente destacando dismorfismos faciais e manchas cutâneas nos membros.....	84
Figura 32- Heredograma do propósito XV.....	85
Figura 33- Características clínicas da paciente destacando dismorfismos faciais, manchas hipocrômicas e hiperocrômicas acompanhando as linhas de Blaschko.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas dos nossos pacientes com Síndrome de Pallister-Killian.....	73
Tabela 2- Porcentagem de células com o isocromossomo 12p nos pacientes com Síndrome de Pallister-Killian.....	75
Tabela 3- Características clínicas dos pacientes sem definição diagnóstica.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADNPM- atraso de desenvolvimento neuropsicomotor

FISH- hibridação *in situ* por fluorescência

MLPA- multiplex ligation-dependent probe amplification

PCR- reação em cadeia polimerase

PKS- Síndrome de Pallister-Killian

cm- centímetro

mm- milímetro

mL- mililitro

μL- microlitro

g- grama

μg- micrograma

ng- nanograma

°C- graus Celsius

rpm- rotações por minuto

iso- isocromossomo

mar- cromossomo marcador

FMUSP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HC- Hospital das Clínicas

ICr- Instituto da Criança

LIM- Laboratório de Investigação médica

RESUMO

Zandoná-Teixeira, AC. **Estudo genético-clínico e molecular em pacientes portadores de manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: As alterações cromossômicas são a primeira suspeita etiológica em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou deficiência cognitiva. Verifica-se que em alguns pacientes esse fenótipo está associado a alterações pigmentares como as manchas cutâneas. Porém, nem sempre o resultado do cariótipo em sangue periférico para esses pacientes revela alterações cromossômicas. Dessa forma, a análise cromossômica de outro tecido, como a cultura e cariotipagem dos fibroblastos da pele, torna-se importante para verificar a ocorrência de mosaicismo oculto que poderia explicar o fenótipo clínico. **OBJETIVOS:** Padronizar e implantar um protocolo para cultura de fibroblastos de pele humana, oriunda de manchas cutâneas de pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações. Estabelecer o método de cariotipagem molecular de fibroblastos em tecido epitelial e realizar a correlação com o fenótipo. **MÉTODOS:** Os pacientes foram provenientes do ambulatório de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICR-HCFMUSP). Foram realizados cariótipos de fibroblastos de pele de 15 pacientes com cariótipo de sangue periférico normal, portadores de manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações. A análise citogenética dos fibroblastos foi feita a partir de biópsia cutânea das manchas, seguida dos seguintes procedimentos: cultura de fibroblastos, processamento, cariotipagem por bandamento G e análise citogenética molecular. **RESULTADOS:** Dentre os 15 casos estudados, 8 apresentaram isocromosomo de 12p (síndrome de Pallister-Killian), 1 apresentou um mosaicismo sexual atípico e os outros 6 apresentaram resultado normal. **CONCLUSÃO:** A análise cromossômica de fibroblastos foi imprescindível para o diagnóstico de pacientes com manchas cutâneas associadas à múltiplas anomalias congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou deficiência cognitiva. A abordagem diagnóstica

adequada é fundamental para conduzir o tratamento de forma apropriada e para definir o prognóstico desses pacientes, sendo também imprescindível para a realização do aconselhamento genético.

Descritores: Nevo; Malformações; Técnicas de cultura de células; Fibroblastos; Citogenética.

ABSTRACT

Zandoná-Teixeira, AC. **Clinical and molecular study in patients with pigmentary skin anomalies associated with developmental delay and/or malformations** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Chromosomal aberrations are the first suspected etiology in individuals with multiple congenital anomalies, developmental delay and/or intellectual disability. This phenotype is sometimes associated with pigmentary skin anomalies. However, in some cases the peripheral blood cells karyotype is normal. Therefore, the cytogenetic analysis of other tissues such as culture and karyotyping of skin fibroblasts is important to verify the occurrence of cryptic mosaicism that may explain the clinical phenotype. **OBJECTIVES:** To standardize and set a protocol for culture of human skin fibroblasts. To perform molecular karyotyping of fibroblasts and establish the correlation with phenotype. **METHODS:** Patients were recruited from the outpatient clinic of the Genetics Unit of Instituto da Criança do Hospital das Clínicas d Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICR-HCFMUSP). The karyotypes of skin fibroblasts were performed in 15 patients with normal blood karyotype, presenting with pigmentary skin anomalies associated with developmental delay and/or malformations. The cytogenetic analysis of fibroblasts was made from skin biopsy of the spots, followed by fibroblast culture, processing, karyotyping by G-banding analysis and molecular cytogenetics. **RESULTS:** Among the 15 cases studied, 8 showed isochromosome 12p (Pallister-Killian syndrome), 1 had atypical sexual mosaicism and the other 6 had normal results. **CONCLUSION:** The cytogenetic analysis of skin fibroblasts is crucial for the diagnosis of patients with pigmentary skin anomalies associated with developmental delay and/or malformations. The proper diagnosis is fundamental for the appropriate treatment, to define prognosis for these patients and essential for the genetic counselling.

Descriptors: Nevo; Malformations; Cell culture techniques; Fibroblasts; Cytogenetics.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As anomalias cromossômicas fazem parte de uma das maiores categorias de doenças genéticas, sendo responsáveis por uma proporção significativa de insucessos reprodutivos, malformações congênitas e deficiência cognitiva (Sharkey et al., 2005; Horovitz et al., 2005). Essas podem ser numéricas (aneuploidias e euploidias) ou estruturais, as quais podem envolver deleções ou duplicações de segmentos cromossômicos, que são tipicamente associados a defeitos congênitos, atraso do crescimento e atraso cognitivo.

Quadros clínicos sugestivos de síndromes cromossômicas nem sempre são confirmados com a cariotipagem clássica em bandamento G, em sangue periférico, e permanecem não diagnosticados. No entanto, esse resultado inicial não descarta a possibilidade da presença de anormalidades cromossômicas concomitantes em outros tecidos, que poderiam explicar o fenótipo apresentado pelo paciente (Frank; Happle, 2007).

Em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) sem etiologia e/ou deficiência cognitiva e cariótipo normal, torna-se importante a análise cariotípica de outro tecido, devido à probabilidade da existência de mosaicismo oculto, no entanto a análise de um segundo tecido não é rotina na prática laboratorial (Frank; Happle, 2007).

Dessa forma, a presença de linhagens celulares diferentes em indivíduos portadores de fenótipo clínico, pode ser muitas vezes sub diagnosticada, pois, usualmente, a análise citogenética restringe-se à cultura de células sanguíneas, mas, como dito anteriormente,

poucas são as investigações de outro tipo de tecido (Frank; Happle, 2007; Oiso et al., 2010).

A escassez de estudos cromossômicos em tecidos diferentes deve-se tanto a dificuldade de obtenção de material celular adequado para a cultura quanto à qualidade das preparações citogenéticas para análise, que depende de protocolos bem estabelecidos. Deste modo, este estudo trará benefício ao paciente pela possibilidade da detecção precoce de possíveis complicações da saúde decorrentes da alteração dos cromossomos detectada no exame de fibroblastos (Oiso et al., 2010).

Embora a técnica clássica em bandamento G seja capaz de detectar anormalidades cromossômicas a aplicação de técnicas moleculares, como a Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) pode representar um aumento substancial na detecção de linhagens celulares aneuplóides presentes em baixas porcentagens, bem como a identificação de possíveis alterações genômicas suspeitas não identificadas pelo cariótipo com bandas (Sharkey et al., 2005).

A técnica de FISH utiliza sondas específicas marcadas por nucleotídeos fluorescentes e geradas por clonagem em vetores e por amplificação *in vitro* que permite o reconhecimento de anomalias numéricas e estruturais em metáfases e em células interfásicas. Essa técnica pode ser empregada em células a fresco, oferecendo uma vantagem ao auxiliar a detecção de alterações cromossômicas em células não submetidas ao cultivo celular, possibilitando, assim, o acesso ao status *in vivo* das possíveis alterações cromossômicas presentes em diferentes tecidos em um mesmo indivíduo (Sharkey et al., 2005; Chauffaille 2005).

O FISH interfásico admite também uma redução do tempo de preparação da amostra para análise, permitindo um acesso rápido e indireto do número de cromossomos

presentes, em uma grande quantidade de núcleos interfásicos, quando a obtenção de células em metáfase é difícil. Além do diagnóstico de inúmeras alterações, a técnica de FISH também possibilita a determinação da origem dos cromossomos envolvidos (Collodel et al., 2006; Shali et al., 2006).

Além da FISH, há outra técnica molecular alternativa denominada MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), que é utilizada para a detecção de deleções e/ou duplicações em doenças genéticas de interesse. Esse método permite a triagem genômica quantitativa de sequências alvo-específicas, baseada na hibridação simultânea e amplificação por reação em cadeia polimerase (PCR) de mais de 50 sondas diferentes em uma única reação. A triagem de alterações subteloméricas ou de microdeleções específicas por MLPA revela uma taxa de 5 a 10% de anomalias em pacientes com cariótipo convencional normal (Cho et al., 2009).

Recentemente, o array-CGH foi descrito como um método capaz de detectar milhões de sítios do genoma de um indivíduo de uma única vez, utilizando uma matriz de fragmentos genômicos dispostos em lâminas de vidro. Usando equipamentos automáticos e “chip de DNA” para a análise de diversos sítios de alterações cromossômicas submicroscópicas, a técnica de array-CGH pode ser considerada a união da biologia molecular com a citogenética convencional (Andrieux e Sheth, 2009). Mesmo com todas essas técnicas atualmente utilizadas, a maioria dos centros de diagnósticos de SUS não possuem os equipamentos adequados e licença de uso dos programas de computador (*software*) para análise, já que essas técnicas mais avançadas possuem custo elevado. Devido à isso, a técnica de array-CGH não foi utilizada no presente estudo.

Assim, neste trabalho, investigaremos pacientes apresentando manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações utilizando

diferentes técnicas de cultura celular e cariotipagem clássica e molecular. A identificação de anormalidades cromossômicas crípticas possibilitará uma melhor correlação cariótipo-fenótipo além do aconselhamento genético aos pacientes portadores e seus familiares.

Diversas síndromes tais como: Pallister-Killian, McCune-Albright, Hipomelanose de Ito, Hiperqueratose Epidermolítica e Incontinência Pigmentar apresentam além do quadro clínico característico, a presença de manchas dermatológicas. Outras síndromes que apresentam manchas cutâneas associadas à dismorfias importantes são: Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, Síndrome de Noonan, Síndrome de Proteus, Xeroderma Pigmentoso e Neurofibromatose (Butt et al., 2010; Vaz et al., 2010) porém, essas têm características clínicas marcantes, não necessitando de investigação em outro tipo de tecido. Outros pacientes portadores de aneuploidias também são descritos como tendo manchas cutâneas, como por exemplo, os portadores de aneuploidias do cromossomo 13, que apresentam displasias pigmentares (Dhar et al., 2009; Golabi et al., 2010).

A maioria desses relatos apresenta anormalidades citogenéticas em mosaicismo, sendo que as linhagens celulares alteradas podem estar presentes em diferentes tecidos.

1.1 Mosaicismo

O mosaicismo é definido como a presença de pelo menos duas linhagens celulares geneticamente diferentes em um indivíduo ou um tecido. Essas linhagens diferentes são derivadas de um único zigoto. O mosaicismo pode ser resultado de uma mutação durante o desenvolvimento que se propaga apenas em um limitado número de células adultas. As mutações que surgem em células únicas podem originar cópias de células geneticamente

diferentes da original (Happle, 1993; Lombillo; Sybert, 2005; Frank; Happle, 2007; Treat, 2010).

Quando há mutação no processo de desenvolvimento, o indivíduo resultante será uma mistura de células (algumas com a mutação, outras sem). O mosaicismo pode ser de origem germinativa (afetando os óvulos ou espermatozoides), ou de origem somática (afetando as outras células não envolvidas na reprodução).

A mutação somática ou pós-zigótica é uma alteração genética que ocorre após a fecundação, na embriogênese, no desenvolvimento fetal ou pós natal (Figura 1). Dependendo do estágio de desenvolvimento em que a mutação ocorre irá determinar quais os tecidos e qual a porcentagem de células dentro do tecido que irá ocorrer a mudança e somente o tecido precursor de células em que tenha ocorrido a alteração é afetado. Geralmente, qualquer tipo de célula pode ser afetada por esse acontecimento, desde gametas, células do sangue, células da pele (Frank; Happle, 2007).

Se a mutação envolver as gônadas, ocorrerá o mosaicismo gonadal no qual o tecido que dá origem aos gametas será mosaico, tendo o risco não para quem possui o mosaicismo, mas para sua futura prole (Youssofian et al., 2002).

A porcentagem de mosaicismo está sujeita ao período de desenvolvimento que surgiu a nova linhagem celular. Uma porcentagem alta de uma linhagem alterada provavelmente está associada a malformações e distúrbios e, haverá deficiência cognitiva quando o cérebro estiver envolvido (Gardner et al., 1994).

FONTE: Nussbaum, 2008

Figura 1- Demonstração esquemática de como uma mutação pode acarretar em uma população de células mutantes após subsequentes divisões mitóticas

O mosaicismismo é um evento clinicamente importante nas síndromes cromossômicas, quando ocorrer de dois ou mais complementos cromossômicos diferentes estarem presentes em um indivíduo, pode ser mosaicismismo numérico, o mais comum, ou estrutural. Em indivíduos portadores da mutação em forma de mosaico, o ganho ou perda da função genética frequentemente é limitado às células e tecidos específicos, e os seus efeitos do mosaicismismo no desenvolvimento variam com a época do evento de não-disjunção, com a natureza da anomalia cromossômica, com as proporções dos diferentes complementos cromossômicos presentes e os tecidos afetados. Assim, o mosaicismismo para mutações de genes únicos, de células somáticas ou germinativas, parece ser uma explicação provável para várias observações clínicas incomuns (Lombillo; Sybert, 2005; Frank; Happle, 2007; Röthlisberger; Kotzot, 2007; Treat, 2010).

Deve-se distinguir o mosaicismismo do quimerismo, que é a união de dois indivíduos geneticamente distintos em um único organismo. Ele ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento, onde células de dois embriões diferentes se unem para dar origem a um único indivíduo, que terá partes formadas por um tipo de células e partes por outro tipo

de células. Já o mosaicismo, como dito anteriormente possui duas ou mais linhagens diferentes derivadas de um único embrião. Portanto, a origem das quimeras é diferente do mosaicismo (Lipsker et al., 2008).

Sendo mais comum que o quimerismo, o mosaicismo deve ser responsável por um grande número de doenças. Na espécie humana, há poucos exemplos de quimeras verdadeiras resultantes da fusão de células de dois embriões, e é quase sempre encontrado quando resultou da união de zigotos do sexo oposto, permitindo várias alterações no desenvolvimento sexual. Já quando o percentual de um tipo celular é muito pequeno, chama-se microquimerismo. Há um caso raro de quimerismo humano onde o indivíduo não possuía malformações, mas possuía duas colorações distintas na pele. O cariótipo de linfócitos do sangue periférico apresentava 50% 46,XX e 50% 46,XY. Já nos fibroblastos da pele, os cromossomos foram somente 46,XY. Neste caso a pigmentação anormal da pele foi imprescindível para o diagnóstico, uma vez que o indivíduo possuía dois tons normais, porém diferentes de cor da pele, e o quimerismo foi confirmado pela análise de antígenos do sangue, que apresentavam duas diferentes populações. A distribuição do pigmento em indivíduos com quimerismo é, geralmente, num padrão geométrico e não ao longo das linhas de Blaschko (Lipsker et al., 2008).

Já os mosaicismos, podem ser confinados a alguns tecidos, mosaicismo pigmentar por exemplo, ou somente a um órgão. É plausível que todos nós sejamos mosaicos em algum tecido do corpo, mesmo em um pequeno número de células, que podem passar despercebidos, e a distribuição das diferentes linhagens celulares pode ser muito variável. O estado mosaico pode também ser responsável por suavizar algum fenótipo clínico que em estado de não mosaico poderia ser mais abrangente (Woods et al., 1994; Lombillo; Sybert, 2005; Frank; Happle, 2007; Treat, 2010; Groesser et al., 2012).

1.2 Mosaicismo pigmentar

O mosaicismo pigmentar é um termo que têm sido usado para descrever os padrões variados de pigmentação na pele e determina um fenótipo cutâneo inespecífico. Muitas anormalidades de pele são caracterizadas por um padrão de mosaico, com regiões da pele afetada e outras não. A presença de duas linhagens celulares na pele pode refletir o padrão de hipo e/ou hiperpigmentação com diferentes complementos de genes relacionados à pigmentação (e com diferentes padrões de produção de melanócitos), não representando uma doença isoladamente (Verghese et al., 1999). Esse mosaicismo pode apresentar diferentes padrões de comprometimento clínico, onde as manchas podem apresentar padrões tais como as linhas de Blaschko, um padrão em xadrez, um em filóide e um irregular sem separação mediana (Figura 2) (Happle, 1993; Lombillo; Sybert, 2005; Ohashi et al., 2005; Frank; Happle, 2007; Treat, 2010).

FONTE: Happle, 1993

Figura 2- Padrões de comprometimento do mosaicismo pigmentar. A. Linhas de Blaschko; B. Padrão em xadrez; C. Padrão filóide; D. Padrão irregular sem separação na linha média

A teoria para a origem das linhas de Blaschko é de que há uma migração ectodérmica, aonde as células ectodérmicas, derivadas da crista neural, incluindo melanoblastos, migram transversalmente ao longo de diferentes caminhos dorso- ventrais do desenvolvimento do embrião dos vertebrados. De acordo com Happle (1993) o crescimento longitudinal e a flexão do embrião contribuem para o padrão conhecido como linhas de Blaschko (Figura 3).

FONTE: Happle,1993

Figura 3- Migração ectodérmica e teoria para o desenvolvimento de linhas de Blaschko. As células derivadas da crista neural migram transversalmente ao longo de diferentes caminhos dorso- ventrais do desenvolvimento do embrião. O crescimento longitudinal e a flexão do embrião contribuem para o padrão conhecido como linhas de Blaschko

Baseado na distribuição das diferentes alterações da pele, Blaschko e colaboradores descreveram um padrão único de linhas bem demarcadas, diferente de qualquer outro padrão linear da pele, aonde na parte de trás, basicamente, há uma forma de V, e na parte da frente, sobre o abdômen, o padrão é em forma de S. Já no couro cabeludo, as linhas são em espiral (Figura 4). A extensão e o padrão de distribuição também dependem do

momento em que ocorreu a mutação causando o mosaicismo (Happle, 1993; Goldberg; Sprecher, 2011; Sarma, 2012; Vreeburg; van Steensel, 2012).

FONTE: Happle, 1993

Figura 4- Reprodução mostrando as linhas de Blaschko aonde na parte de trás, basicamente, há uma forma de V, e na parte da frente, sobre o abdômen, o padrão é em forma de S. Já no couro cabeludo, as linhas são em espiral

A detecção do mosaicismo pode ser feita em um único tipo celular, como nos linfócitos, ou necessitar de investigação em outros tecidos. Normalmente, utiliza-se a citogenética clássica de fibroblastos da pele para esta detecção, porém mosaicismos confinados a outros tecidos não podem ser excluídos com esses procedimentos. Além disso, encontram-se diversos níveis de mosaicismo pigmentar cromossômico em diferentes tecidos e em localizações variadas dentro do mesmo tipo de tecido, podendo, esses, não serem diagnosticados se estiverem sendo sub- representados na população de

células utilizadas para análise. Assim, a área da biópsia não garante a presença de alterações, precisando, às vezes, de coleta de mais de um local para ser identificada a alteração (Cheung et al., 2007). Diferentes técnicas de citogenética molecular também são utilizadas para diagnóstico de mosaicismo pigmentar quando as técnicas convencionais não conseguem identificá-los (Lombillo; Sybert, 2005; Frank; Happle, 2007; Happle, 2010; Treat, 2010).

Há uma grande variedade de relatos de casos de mosaicismo pigmentar em pacientes portadores de anomalias cromossômicas específicas nos tecidos, com variados desequilíbrios genômicos (como, por exemplo, mosaicismo da trissomia do cromossomo 2, 5, 7, 12, 15, 18, 20, 22). Há também relatos de trissomia e/ou monossomia do cromossomo 13; anormalidades envolvendo o cromossomo X; e cromossomos marcadores também podem ocorrer (Woods et al., 1994; Taibjee et al., 2009; Golabi et al., 2010).

A maioria dos casos apresenta um cariótipo para linfócitos normal com mosaicismo para o cromossomo atípico nos fibroblastos, porém, em contraste, a tetrassomia para o braço curto do cromossomo 9 (9p) aparece em maior frequência nos linfócitos do que nos fibroblastos. Sendo assim, é importante reconhecer o quadro clínico para realização do estudo citogenético de outro tipo celular, quando necessário, para um diagnóstico mais completo (Zen et al., 2005; Frank; Happle, 2007; Happle, 2010; Golabi et al., 2010).

De acordo com Woods e colaboradores (1994), o diagnóstico clínico de mosaicismo é complexo, sendo os achados clínicos mais comuns: assimetrias, crescimento anormal, dismorfismos, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) e anomalias pigmentares (Pagon et al., 1979).

1.3 Doenças associadas a manchas pigmentares e mosaicismo

1.3.1 Síndrome de Pallister-Killian

A Síndrome de Pallister-Killian (PKS- OMIM #601803) é uma doença genética causada por uma anormalidade cromossômica em mosaico (tecido-limitado), envolvendo o cromossomo 12. Esta síndrome foi independentemente relatada, pela primeira vez, por Pallister e colaboradores (1977), Teschler-Nicola e Killian (1981) depois, devido à combinação das características clínicas. Os sinais clínicos mais comumente apresentados são manchas hipo ou hiperpigmentares da pele, dismorfismos faciais, fronte proeminente, hipertelorismo, alopecia localizada, nariz curto com narinas antevertidas, deficiência cognitiva e convulsões; também podem apresentar cardiopatias congênitas, ponte nasal depressa, pescoço curto, anormalidades genitais e mamilos supranumerários (Schinzel 1991; Huang et al., 2007; Smigiel et al., 2008; Vogel et al., 2009; Yeung et al., 2009).

O mosaicismo de tecido é uma característica específica dessa síndrome, e a anomalia citogenética mais comum nesses casos é a presença de um cromossomo marcador metacêntrico pequeno extra. Esse é um isocromossomo (cromossomo que perdeu um de seus braços e o substituiu com uma cópia exata do seu outro braço) do braço curto do cromossomo 12, nos fibroblastos (iso 12p extranumerário). A maioria dos fibroblastos tem, então, 47 cromossomos, com um cromossomo metacêntrico pequeno extra. Peltomaki e colaboradores (1987) mostraram que os 2 braços curtos são idênticos, indicando, assim, o isocromossomo 12p. O fenótipo da PKS pode ser devido à duplicações completas ou parciais de 12p, ou pode resultar da duplicação ou triplicação de um número muito pequeno de genes críticos no cromossomo 12p (Izumi et al., 2012).

O diagnóstico dessa síndrome baseia-se nas características clínicas e no exame citogenético de fibroblastos cutâneos, uma vez que o exame de linfócitos do sangue periférico costuma apresentar resultado normal. A presença do isocromossomo extranumerário é detectada nos fibroblastos, principalmente com a utilização de técnicas moleculares de citogenética (FISH), utilizando sondas de DNA específicas para cromossomos 12p (Ohashi et al., 2005; Liberati et al., 2008; Shamdeen et al., 2009; Vogel et al., 2009).

Geralmente o mosaicismo nessa síndrome caracteriza-se pela presença de linhagens normais e anormais no mesmo tecido, sendo que a proporção de células contendo isocromossomo 12p nos linfócitos é descrita de 0 a 2%, e nos fibroblastos da pele é de 50 a 100%, já o isocromossomo 12p não-mosaico deve ser incompatível com a vida, uma vez que não há relatos dessa ocorrência (Stalker et al., 2006; Baglaj et al., 2008; Yeung et al., 2009).

1.3.2 Síndrome McCune-Albright

A síndrome McCune-Albright (MAS- OMIM # 174800) é uma doença genética rara, com incidência ainda não totalmente esclarecida, resultante de uma mutação somática, em mosaico, que promove a ativação do gene *GNAS1* e seu espectro depende diretamente da distribuição de tecidos de células mutantes (Rey et al., 2006; Sallum et al., 2008). Esta, foi primeiramente descrita por McCune e Bruch (1937) e Albright e colaboradores (1937, 1938).

Clinicamente ela é definida pela combinação de manchas cutâneas (*café-au-lait*), displasias fibrosas poliósticas e endocrinopatias (como puberdade precoce e/ou

hipertireoidismo), geralmente os portadores dessa síndrome apresentam uma grande mácula *café-au-lait* assimétrica, com bordas irregulares, onde a apresentação clínica da doença é altamente variável. O diagnóstico se dá pela correta identificação do quadro clínico, e por meio de exames laboratoriais incluindo a dosagem de hormônios. Não foram encontrados relatos de anormalidade citogenética associada a essa síndrome na literatura, porém em exames moleculares já foram detectadas alterações no cromossomo 20 (20q13.32), no gene GNAS1 (Lumbroso et al., 2004; Rey et al., 2006; Sallum et al., 2008).

1.3.3 Hipomelanose de Ito

A hipomelanose de Ito (HMI- OMIM #300337) é uma hipocromia segmentar que se caracteriza por manchas cutâneas, decorrentes de uma rara alteração na mielinização, podendo estar associada a várias manifestações clínicas, tais como: neurológicas, oftalmológicas e malformações em geral. Ela está dentre as mais graves doenças envolvendo manchas cutâneas, pois nela as manchas são distribuídas ao longo das linhas de Blaschko, principalmente extensas e bilaterais, e podem se manifestar em diferentes estágios devido ao mosaicismo. Muitos distúrbios de pele são caracterizados por um padrão de mosaico, com regiões da pele afetada e outras não, e as lesões cutâneas podem apresentar grande variedade clínica quanto ao seu tamanho, forma cor e local (Shobha et al., 2006; Sánchez et al., 2008).

Esse distúrbio pigmentar está associado ao mosaicismo citogenético, geralmente envolvendo todos os cromossomos (incluindo o cromossomo X/ Xp11) por isso a grande variabilidade fenotípica e, o mapeamento do ponto de quebra nos casos de translocações

pode contribuir na identificação de genes específicos. Porém, nem sempre pode ser diagnosticado através de cariótipo de linfócitos do sangue ou fibroblastos da pele, sendo utilizado também o método de investigação por citogenética de queratinócitos. Nesses casos, assim como no caso de fibroblastos, são feitas culturas celulares através de biópsias de pele, retirando partes das manchas e, o método de hibridação fluorescente *in situ* é comumente utilizado para diagnóstico molecular (Taibjee et al., 2009).

Esse mosaico faz parte de um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por padrão de hipopigmentação da pele, seguindo as linhas de Blaschko. Este padrão de hipopigmentação reflete a presença de duas linhagens celulares com diferentes complementos de genes de pigmentação e diferentes padrões de produção de melanócitos, não representando, isoladamente, uma doença (Horn et al., 2002; Niessen et al., 2005; Taibjee et al., 2009). Assim, esse mosaicismo cromossômico somático tem sido associado como a principal causa dos distúrbios pigmentares, particularmente Hipomelanose de Ito, a qual foi classificada como uma doença neurocutânea sistêmica (Happle, 1993; Verghese et al., 1999).

1.3.4 Hiperqueratose epidermolítica

A hiperqueratose epidermolítica (EHK- OMIM# 113800) ou eritrodermia ictiosiforme bolhosa congênita (BCIE) é uma doença dermatológica, autossômica dominante, descrita com padrão em mosaico pigmentar, com fenótipos diferindo em presença ou ausência de eritrodermia e de comprometimento palmoplantar; e diferentes extensões do acometimento. Há casos descritos de herança autossômica recessiva, o que tem grande importância no aconselhamento genético. Este mosaicismo pode ser

representado com áreas de hiperqueratose alternando com pele normal, geralmente seguindo as linhas de Blaschko (Muller et al., 2006).

Não há relatos de anormalidade citogenética associada a essa síndrome na literatura, ela pode ser causada por mutação heterozigótica no gene-1 queratina (KRT1, cromossomo 12q13.13) e por mutação heterozigótica ou homozigótica do gene de queratina 10 (KRT10, no cromossomo 17q21.2) (Muller et al., 2006; Ross et al., 2008; Kocaturk et al., 2010).

1.3.5 Incontinência Pigmentar

A Incontinência Pigmentar (IP- OMIM# 308300) ou síndrome de Bloch-Sulzberger é uma genodermatose rara, segregada como um distúrbio ligado ao X dominante (causada por uma mutação no gene NEMO envolvendo os éxons 4 e 10 na região Xq28) (Franco et al., 2006). Alguns autores verificaram alterações no braço curto do cromossomo X (Xp11), sendo a causa ainda desconhecida. Nas mulheres afetadas provoca anormalidades variáveis da pele, cabelos, unhas, dentes, olhos, esqueleto e coração. Geralmente é fatal em homens e, as células que expressam o cromossomo X mutado, são selecionadas no momento do nascimento. Caracteriza-se por hiperpigmentação cutânea seguindo as linhas de Blaschko, com frequente envolvimento sistêmico e ausência de fatores dismórficos. As anomalias pigmentares são bem características sendo facilmente diferenciadas clinicamente de outras anomalias uma vez que as lesões são precedidas de três estágios: dermatite linear com vesículas e eritema; anomalias verrucosas lineares e manchas hiperpigmentadas em listras entre marrom e cinza. Podem ocorrer casos de hipopigmentação também (Happle, 1993; Kuster; König, 1999).

1.3.6 Mosaicismo do cromossomo 13

A trissomia do cromossomo 13 é uma doença autossômica considerada uma das mais frequentes em nativos. As principais anomalias apresentadas pelos portadores dessa síndrome consistem em atraso de crescimento e desenvolvimento, baixo peso ao nascimento, microcefalia, aplasia cútis, microftalmia, lábio leporino, polidactilia (Dhar et al., 2009).

O prognóstico é melhor nos casos de pacientes portadores de trissomia do cromossomo 13 por translocação ou mosaicismo cromossômico, nos casos de trissomia livre do cromossomo 13 (Síndrome de Patau) raros sobrevivem. Em alguns casos de mosaicismo do cromossomo 13 há relatos de sua associação com as displasias de pele e, nessas circunstâncias, há necessidade de fazer o cariótipo dos fibroblastos para diagnóstico. Há relatos de monossomia do cromossomo 13 em tecidos específicos (Golabi et al., 2010). Bygum e colaboradores (2011) relatam que a hipomelanose filóide está ligada ao mosaicismo de trissomia do cromossomo 13, Happle (2010) relaciona a hipomelanose filóide com múltiplos defeitos congênitos e anormalidades do mosaicismo do 13. Assim, enfatiza-se a importância da cariotipagem de pele nas situações clínicas em que há associação de malformações com displasias pigmentares (Dhar et al., 2009).

1.4 Justificativa

O ambulatório de genética do Instituto da Criança (ICr)- Hospital das Clínicas- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) atende principalmente pacientes com múltiplas malformações congênitas associadas ou não à deficiência cognitiva. Dentre esses pacientes muitos apresentam machas cutâneas que podem ou não estar associadas ao seu quadro clínico e que necessitam uma investigação cariotípica mais detalhada.

A padronização e implantação da técnica da cultura de fibroblastos no Laboratório de Investigação Médica (LIM 36) e da subsequente cariotipagem tanto clássica quanto molecular permitirá o atendimento de um grupo de pacientes que permanece sem diagnóstico.

Consideramos imprescindível para esses pacientes um estudo citogenético mais minucioso que contemple ambos os tecidos, sanguíneo e epitelial, com o objetivo de descartar um mosaicismo críptico e obter um diagnóstico final. A investigação cromossômica concomitante de dois tecidos permitirá uma correlação cariótipo-fenótipo mais fidedigna além de possibilitar o aconselhamento genético para as famílias.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Padronizar e implantar um protocolo para cultura de fibroblastos de pele humana, oriunda de manchas cutâneas.
- Estabelecer o método de cariotipagem molecular de fibroblastos em tecido epitelial.
- Descrever o quadro clínico dos achados citogenéticos.
- Realizar a correlação cariótipo-fenótipo.

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo (CAPPesq – 0370/10).

Foram selecionados 15 pacientes atendidos na Unidade de Genética Clínica do Instituto da Criança (ICr) do HCFMUSP, sendo 5 do sexo masculino e 10 do sexo feminino. As idades variaram desde 1 mês até 16 anos, uma vez que o atendimento da Unidade de Genética Clínica pode ser feito desde o nascimento até os 21 anos de idade.

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, onde o critério de inclusão foi: pacientes sem diagnóstico, portadores de manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações em acompanhamento no Ambulatório de Genética Clínica. Os pacientes só participaram deste estudo após autorização e assinatura dos pais ou responsáveis legais pelos mesmos.

3.2 Avaliação Clínica

A avaliação clínica foi realizada em colaboração com os médicos assistentes do Ambulatório de Genética e compreendeu em anamnese, estudo genealógico, exame físico

e registro fotográfico. Os demais dados clínicos necessários foram obtidos por meio de revisão de prontuários (ICr), bem como os resultados do exame citogenético de sangue periférico.

Após a avaliação clínica, os pacientes que se adequavam ao estudo foram submetidos à biópsia de mancha cutânea para cultura de fibroblastos, processamento e coloração em bandamento G para análise citogenética clássica e molecular.

A coleta foi realizada pelos médicos residentes da Unidade de Genética, com *punch*, após anestesia local, intradérmico e de maneira totalmente estéril. A biópsia de pele foi colocada imediatamente após a coleta em um frasco estéril, contendo meio de cultura, e transportada para o laboratório.

3.3 Citogenética clássica e molecular de fibroblastos a partir de biópsia cutânea

3.3.1 Citogenética clássica de fibroblastos

As amostras dos tecidos de pele para as culturas de fibroblastos foram coletadas pelos médicos assistentes do Ambulatório de Genética, por meio de biópsia das manchas cutâneas. As biópsias foram colhidas com auxílio de *punch* estéril (4 mm de diâmetro), sob anestesia local. Sempre que possível foram colhidas biópsias do centro da mácula, na região mais hiperocrômica ou hipocrômica, variando o local de coleta de acordo com a região corporal na qual cada paciente apresentava as lesões. As biópsias foram transportadas até o Laboratório de Investigação Médica (LIM 36) em um frasco estéril contendo solução salina 0,9% com adição de antibiótico e antifúngico. Os frascos foram

rotulados para identificação com nome do paciente, número de registro, data e tipo de tecido coletado. O material foi processado imediatamente após a entrada no laboratório.

Em fluxo laminar, a técnica foi aplicada (modificada de Rooney, 2001), cada fragmento de pele foi transferido para uma placa de *petri* esteril de 35 mm de diâmetro, 10 mm de altura, com alta transparência e fundo livre de estrias aumentando a área útil de crescimento (Figura 5), onde foi lavado com meio Ham F10 (Gibco®). Com o auxílio de instrumental cirúrgico esteril, a pele foi fragmentada em porções menores (Figura 6). Utilizando a ponta de uma pipeta *pasteur* esteril, os fragmentos foram colocados em contato com a superfície interna de garrafas de cultura de 25 cm² (TPP®) contendo 4 mL de meio Amniomax basal (Gibco®) suplementado com 1 mL de suplemento Amniomax (Gibco®). As culturas foram então incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ por sete dias.

Figura 5- Exemplo de lavagem do tecido na placa de *petri* esteril

Figura 6- Exemplo de fragmentação do tecido em partes pequenas

Após esse período, com o auxílio de microscópio invertido, observou-se a confluência celular. No caso de pouca proliferação, apenas houve troca do meio de cultura e as culturas voltaram para a estufa. Esse procedimento foi repetido até completa proliferação da célula (Figura 7), quando o meio de cultura foi desprezado, as células lavadas com meio Ham F10 (Gibco®) e então tratadas com tripsina EDTA (Gibco®) a fim de descolar o tapete celular aderido à garrafa de cultura. As células foram ressuspensas e repicadas para uma garrafa de cultura de 75 cm² (TPP®) contendo 6 mL de meio Amniomax basal (Gibco®) suplementado com 2 mL de suplemento Amniomax (Gibco®). As culturas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias, sempre observando a proliferação celular. No momento em que atingiram aproximadamente 80% de confluência (preenchimento de toda a superfície da garrafa), as culturas foram então processadas.

Figura 7- Exemplo da proliferação celular na linhagem dos fibroblastos

Ao final do período de incubação, acrescentou-se 400 µL de solução uso de colcemid (Gibco®) e as culturas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa de CO₂, por quatro horas. Após esse período, todo o conteúdo de cada garrafa foi transferido para um tubo falcon de 50 mL (Corning®). Cada cultura foi lavada com meio Ham F10 (Gibco®) e o

conteúdo adicionado ao mesmo tubo falcon contendo o meio de cultura. A garrafa de cultura foi, então, novamente tratada com tripsina EDTA (Gibco®) e o material proveniente adicionado ao mesmo tubo falcon. O tubo foi então centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 8 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) aquecida a 37 °C. Os tubos falcon de cultura foram novamente incubados em estufa a 37 °C, na posição vertical por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 0,5 mL de solução fixadora constituída por metanol (Synth®) e ácido acético glacial (Synth®), na proporção 3: 1, com o intuito de interromper a hipotonia. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento, foram adicionados 6 mL de solução fixadora e o material foi homogeneizado. Esse processo foi repetido por três vezes e o material final obtido foi utilizado para confecção das lâminas.

O material proveniente da cultura de fibroblasto foi gotejado, sobre “banho maria” a 60 °C, em 6 lâminas previamente lavadas com sabão líquido e água destilada.

3.3.2 Coloração por bandamento G

As lâminas envelheceram por 48 horas em estufa a 60 °C. Após, receberam tratamento com solução de tripsina (1 g de tripsina 1: 250 (Gibco®) diluída em 100 mL de tampão dulbeco). As lâminas foram imersas por nove segundos nessa solução à temperatura ambiente e enxaguadas em tampão fosfato (6,81 g de KH₂PO₄ e 0,88 g de NaOH, diluídos em água destilada). Em seguida, foram coradas por solução de corante

Giemsa (Merck®) a 2% por 5 minutos, enxaguadas em água corrente e secas em temperatura ambiente.

3.3.3 Análise cromossômica sob bandamento G

Os cariótipos foram analisados em microscópio óptico Akioskop Zeiss® e as imagens registradas pelo sistema de captura de imagens Metasystem® Ikaros Version 5.00. Foram analisadas 20 metáfases sob bandamento G, sendo os cromossomos classificados conforme o ISCN (2009), quando necessário, 50 células foram analisadas. A quantidade de células analisadas variou de acordo com a qualidade do material obtido.

As imagens digitais com os resultados das hibridações foram capturadas usando o microscópio Akioskop Zeiss®, equipado com lâmpada 100W, por epi iluminação, e jogo de filtros Zeiss® Fluoresceína-iodeto de propídio FITC-PI, BP 450-490, FI 510 e BP 520 (Cat.# 487709) e pelo sistema ISIS (Metasystem®).

Para todas as sondas utilizadas, foram analisadas 10 metáfases sem sobreposição, que apresentaram sinais separados e claros. O registro foi feito em folha padronizada seguindo as normas do *American College of Medical Genetics*. A documentação foi realizada pela captura das células analisadas pelo sistema de imagem.

3.3.4 Citogenética molecular de fibroblastos

3.3.4.1 FISH

Realizamos a técnica de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) nos casos de Síndrome de Pallister-Killian para caracterizar a anormalidade cariotípica. 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 centroméricas, sondas subteloméricas de 12p (Cytocell®), e/ou sondas de pintura cromossômicas para diferentes cromossomos.

As lâminas contendo material fixado foram tratadas com solução de 2xSSC a 37 °C durante 60 minutos. Em seguida, o material foi submetido à desidratação em banhos seriados de etanol (Merck®) 70%, 80% e 100% durante dois minutos cada, e secos à temperatura ambiente. Enquanto isso, foram aliquotados em um microtubo tipo *ependorf* 7 µL do tampão de hibridação, 1 µL da sonda de interesse e 2 µL de ddH₂O já centrifugados brevemente.

Para a denaturação do DNA, as lâminas foram imersas em solução de formamida a 70% e 2xSSC7,0 (Sigma®) durante dois minutos, em “banho maria” a 73 °C e foram lavadas imediatamente em etanol (Merck®) 70%, 80% e 100% gelados, sucessivamente, durante dois minutos em cada. Após a secagem completa das lâminas, aplicou-se 10 µL da sonda previamente denaturada em “banho maria” a 73 °C por cinco minutos e a área foi recoberta com lamínula e adequadamente vedada.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara úmida a 37 °C durante 12 a 16 horas. Passado esse período, foi realizada a lavagem pós-hibridação conforme procedimento descrito pelo fabricante. A contra coloração foi obtida com aplicação direta de 20 µL de DAPI II.

3.3.4.2 MLPA

Realizamos a técnica Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) para caracterizar a anormalidade cariotípica de alguns pacientes. Essa técnica baseia-se em:

Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, foi obtido material da mucosa oral do paciente e/ou fragmento de pele. O material genético foi extraído pelo QIAamp DNA Blood Midi Kit (250) (QIAGEN, Valencia, Califórnia) segundo protocolo fornecido pelo fabricante com algumas modificações, incluindo a redução do volume de eluição, de 250 µL para 150 µL. Com essa modificação houve uma concentração maior de DNA genômico, ideal para futuras repetições, se necessário, e para a alta sensibilidade das reações de MLPA.

Durante o processo de aperfeiçoamento da técnica, aumentamos a velocidade e o tempo de centrifugação, evitando retenção de amostra na coluna de sílica. Na etapa de eluição das amostras, a redução do volume aplicado na coluna de sílica, permitiu uma concentração maior de DNA, ideal para a alta sensibilidade das reações de MLPA.

Em seguida à extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanoview - GE®) e as amostras para uso imediato foram diluídas em TE (Tris-EDTA 10:1) com concentração final de 50 ng/μL. Os tubos com DNA total foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Reações de MLPA

Para as reações de MLPA foram utilizados dois kits comerciais: P036 e P070 que possibilitam a investigação de alterações subteloméricas de todos os cromossomos. As reações foram realizadas de acordo com os protocolos do fabricante dos kits-probemix (MRC- Holland®, Amsterdam, The Netherlands) também com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes.

Aproximadamente 250 ng de DNA genômico (5μL) foram adicionados a um microtubo e levados ao termociclador (Veriti® Thermal Cycler – Life Technologies) para denaturação a 98 °C por 15 minutos. Em seguida, uma mistura das sondas (específicas para cada kit) e solução tamponada foi adicionada ao DNA denaturado, para o processo de hibridação das sondas de MLPA ao DNA a 60 °C por 3 horas.

Sem retirar os tubos do termociclador, soluções tamponadas juntamente com a enzima Ligase, foram adicionadas à solução de hibridação para a ligação das sondas em cada região alvo específica a 54 °C por 15 minutos. Na última etapa, em temperatura ambiente, devido a *Taq* Polimerase ser termoestável, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados à solução de ligação, para a amplificação somente dos fragmentos unidos pela ligase.

Assim, os produtos amplificados foram colocados em microplacas juntamente com marcador de peso molecular (LIZ - GS600) e formamida HiDi (Life Technologies), e levados ao sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies) para as reações de análise de fragmentos.

Por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em todas as reações de MLPA foram utilizados pelo menos três controles normais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para padronização da citogenética de fibroblastos, inicialmente foram necessários vários testes com protocolos diferentes realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 36) (ICrHCFMUSP). Para os testes de padronização da cultura celular, foram utilizadas amostras residuais de procedimento cirúrgico (prepúcio), fornecidas pelas equipes de cirurgia pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICrHCFMUSP). O material foi coletado pela equipe cirúrgica em frascos estéreis contendo solução salina 0,9%.

Em nenhum dos primeiros testes houve crescimento celular adequado. Devido a isso foram feitos outros testes com variação de constantes que pudessem ser interferentes, como o tempo de cultura; drogas e nutrientes do meio de cultura; resistência a colchicina; meios diversos; e diferentes tipos de garrafas de cultura celular. Depois de esgotar diversos fatores que poderiam interferir no crescimento celular adequado, das várias constantes usadas, mediu-se a temperatura da estufa. Aparentemente estava adequada, porém as culturas não cresciam. Sendo necessário realizar um teste de constância de temperatura (aferição durante longo período).

Devido às dificuldades iniciais, realizou-se um experimento auxiliar da técnica de cultura de fibroblastos em um laboratório colaborador, sob a supervisão da Dra. Mirian Yumie Nishi, no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42). Este laboratório foi escolhido por fazer parte do complexo HC e por apresentar sucesso em culturas de fibroblasto com outros tipos de tecido.

Mesmo tendo protocolo similar ao nosso, testamos também diferentes meios, diferentes modos de repicagem celular e diferentes garrafas para tecido. Nesse laboratório, obtivemos sucesso no crescimento celular utilizando todos os nossos materiais (meios, garrafas, entre outros), ao mesmo tempo as culturas do LIM 36 continuavam a ser testadas por outras variáveis, e pudemos constatar, ao final, que o fluxo de CO₂ era inconstante o que provocava o problema na estabilidade do crescimento celular nas culturas no LIM 36.

Assim, foi feito o conserto da estufa, que estava com oscilação inadequada da temperatura e do CO₂, defeitos de difícil detecção.

Após o conserto da estufa, o presente estudo pode ser realizado no LIM 36 e, de acordo com o objetivo do trabalho, a padronização e implantação da cultura celular de fibroblastos foram efetivadas.

A padronização constou com as seguintes etapas: cultura de fibroblastos a partir de biópsia de mancha cutânea, processamento, análise citogenética convencional por bandamento G e análise citogenética molecular descritos anteriormente.

Dos 15 casos realizados nesse estudo, 8 apresentaram a Síndrome de Pallister-Killian (isocromossomo 12p extranumerário), 1 apresentou um mosaicismo sexual atípico nas células dos fibroblastos de pele e os outros 6 apresentaram resultado normal para cariótipo de fibroblastos, porém não descartamos mais investigações para esses casos.

4.1 Descrição dos casos com resultados alterados

4.1.1 Caso I

Figura 8- Heredograma do propósito I

Recém-nascido, 1ª gestação materna, pais jovens, sadios e não consanguíneos (Figura 8). Nasceu de parto cesáreo, a termo, com peso de 3050 g, 47 cm e perímetro cefálico 34 cm, genitália ambígua e apgar de 8,9 e 9. Com 48 horas de vida apresentou hipoglicemia de difícil controle e fez uso de corticóide. Inicialmente suspeitou-se de hiperplasia congênita suprarrenal, que foi afastada.

O exame físico com um mês de vida revelou: assimetria facial (lado esquerdo maior que lado direito), macroglossia (lado esquerdo maior que lado direito), hérnia umbilical cutânea, membros assimétricos (membro superior esquerdo maior que membro superior direito e membro inferior direito maior que membro inferior esquerdo), genitália ambígua com falus de 1,5 cm, gônadas não palpáveis e presença de manchas cutâneas hipocrômicas na região frontal e no ombro com extensão no braço esquerdo (Figura 9).

Figura 9- Características clínicas da paciente destacando assimetria facial, macroglossia, membros assimétricos e manchas cutâneas

Os exames complementares foram: Ultrassom de abdome que apresentou cistos hepáticos e discreto aumento do rim esquerdo; Ultrassom pelve revelou presença de útero e vagina compatível com sexo feminino; Ecocardiograma apresentou aumento do ventrículo esquerdo; Alfafetoproteína sérica normal. A pesquisa SRY foi positiva.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método mostrou cariótipo normal na pele sem mancha e mosaicismo de cromossomos sexuais na pele com mancha hipocrômica. Sendo o resultado:

- região de mancha hipocrômica: 46,XX[44]/46,XY[6] (bandamento G: 50 células).
- região de pigmentação normal: 46,XX (bandamento G: 50 células).

O mosaicismo de cromossomos sexuais em sangue periférico causa um quadro clínico de síndromes já amplamente discutidas na literatura, como a Síndrome de Turner

e a Síndrome de Klinefelter, no entanto, esse mesmo mosaicismo confinado a um tecido específico e a uma região de mancha pigmentar é um achado raro na literatura.

A paciente apresentou ao nascimento uma genitália ambígua que foi corrigida cirurgicamente, mas aparentemente não apresenta um quadro compatível com síndromes que envolvam os cromossomos sexuais.

Amostras de sangue da paciente foram enviadas a outro laboratório colaborador para investigação de metilação do cromossomo 11p15 para pesquisar a suspeita da Síndrome de Beckwith-Wiedemann e os resultados foram negativos.

Lipsker et al., (2008) descreveram um caso de quimerismo com dois tons normais, porém diferentes de pele, e mosaicismo sexual atípico, no qual o sangue periférico apresentava 50% 46,XX e 50% 46,XY e os fibroblastos da pele apresentavam 46,XY.

No momento, estamos investigando a hipótese de ser um microquimerismo e realizando um levantamento da literatura para confecção de um artigo.

4.1.2 Caso II

Figura 10- Heredograma do propósito II

Paciente do sexo feminino, 4ª gestação materna, mãe de 36 anos, pai de 47 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 10). A mãe refere três abortos anteriores sendo dois provocados e um espontâneo. Nasceu de parto cesáreo, a termo, peso de 2450 g, comprimento 44 cm, perímetro cefálico de 35 cm e apgar de 8 e 10. Ela evoluiu com hipotonia e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor.

O exame físico com oito meses de vida revelou: peso 7000 g, comprimento 66 cm e perímetro cefálico de 44 cm. Apresentava fácies grosseira, dolicocefalia, alopecia bitemporal, fronte ampla, sobrancelhas e cabelos esparsos, epicanto com nistagmo horizontal, hipertelorismo, nariz achatado, filtro convexo, narinas antevertidas, fenda no palato mole, otite bilateral, clinodactilia do 5º dedo, presença de mancha hipocrômica na fronte direita e manchas hiperocrômicas nos membros.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico realizado com um dia de vida, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XX,+i(12p) nas 30 células analisadas.

Foram analisadas 30 metáfases pela técnica de FISH (de material da mucosa oral da paciente) utilizando a sonda subtelomérica de 12p Cytocell®, observando-se marcação quádrupla em 24 células e marcação dupla (normal) em 6 células analisadas, confirmando a síndrome de Pallister-Killian (PKS).

Nesse caso observou-se um cromossomo marcador na citogenética clássica de fibroblastos, de acordo com a suspeita clínica do mesmo acreditou-se ser um isocromossomo do cromossomo 12 (12p). A técnica de FISH pode comprovar o cromossomo extranumerário como o isocromossomo 12p, consequentemente confirmando o diagnóstico clínico da PKS. A maioria dos casos relatados apresenta

cariótipo normal em linfócitos e cariótipo anormal em fibroblasto (12p extranumerário), como na nossa paciente.

4.1.3 Caso III

Figura 11- Heredograma do propósito III

Paciente do sexo masculino, 1ª gestação materna, mãe de 37 anos, pai de 44 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 11). A mãe relata sangue mensal (dois dias e em pequena quantidade) e uso de atenolol contínuo (duas cápsulas por dia). O parto foi normal, peso ao nascimento 4050 g, comprimento de 49,5 cm, perímetro cefálico de 37 cm, idade gestacional por volta de 7 meses e, apgar de 5 e 8.

O exame físico com cinco meses de vida revelou: peso 4400 g, comprimento 54,5 cm e perímetro cefálico de 40 cm. Apresentava fácies grosseiro, hipertricose, hipertelorismo, base nasal achatada, narinas antevertidas, filtro convexo, palato alto, lábio superior fino, orelhas assimétricas, hipotonia, pescoço curto com sobra de pele, sopro cardíaco, aneurisma do septo interatrial, hérnia umbilical, hérnia inguinoescrotal, pés em “mata borão”, mãos fechadas e prega palmar única (Figura 12). Não possuía manchas, porém devido à suspeita clínica indicou-se o estudo de fibroblastos.

Figura 12- Características clínicas do paciente destacando hipertelorismo, base nasal achatada, lábio superior fino e hérnia inguinoescrotal

Os exames complementares foram: Ecocardiograma apresentando aneurisma septointeratrial, Ultrassom de crânio normal, Eletroencefalograma normal.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XY sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XY,+i(12p)(p10)[24]/46,XY[6] das 30 células analisadas. A cariotipagem molecular não foi feita devido à insuficiência de material.

Confirmou-se, assim, com a citogenética de fibroblastos, mais um caso de Síndrome de Pallister-Killian (PKS), aonde o paciente apresentou a maioria das características clínicas descritas na literatura. Uma vez que é uma condição clinicamente heterogênea e as manifestações fenotípicas são, geralmente, graves, é necessário o estudo de mais de um tipo de tecido.

4.1.4 Caso IV

Figura 13- Heredograma do propósito IV

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 38 anos, pai de 40 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 13). Nasceu de parto cesáreo, a termo, peso ao nascimento 3785 g, comprimento de 48 cm, perímetro cefálico de 36 cm e apgar de 5 e 8.

O exame físico com oito anos e oito meses de vida revelou: peso 19000 g, comprimento 110 cm e perímetro cefálico de 49,5 cm. Com 6, 7 meses fez fisioterapia por um ano, parou, e aos três anos de idade voltou a fazer. Apresentava alopecia temporal, filtro longo, hipertelorismo, lábio superior fino, narinas antevertidas, sobrancelha esparsa, surdez unilateral.

Apresentou convulsão desde os 3 anos de idade e fez uso de gardenal. Não fala nenhuma palavra, mas reconhece a fala. Tem problemas de sono. Não possuía manchas, porém devido à suspeita clínica indicou-se o estudo de fibroblastos.

Os exames complementares foram: Ecocardiograma normal e Avaliação oftalmológica normal. Ressonância magnética apresentou disgenesia do corpo caloso com lipoma, escassez da substância branca relacionada a rarefações da mielina. Raio-X de tórax normal.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XX,+i(12)(pter-p10:p10-pter) nas 30 células analisadas, sendo confirmado a Síndrome de Pallister-Killian (PKS) em 100% das células analisadas o que corrobora com a literatura nos casos típicos dessa síndrome, aonde todas as células de fibroblastos apresentam o cromossomo 12p extranumerário. A cariotipagem molecular não foi feita devido à insuficiência de material.

Algumas características clínicas se destacam nesse paciente, como o caso de convulsões, corroborando com a literatura (Hansen et al., 2010).

4.1.5 Caso V

Figura 14- Heredograma do propósito V

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 18 anos, pai de 22 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 14). A mãe relata Ultrassom fetal com 3, 4 meses normal, sem sangramento. Nasceu de parto normal, a termo, peso de 2445 g ao nascimento, perímetro cefálico de 31,5 cm e apgar 7,9 e 9.

O exame físico com 45 dias de vida revelou: peso 3595 g, comprimento 47 cm e perímetro cefálico de 35 cm. Fez estudo do sono que revelou apnéia. Apresentava fáceis grosseiro com aparente hipertelorismo, ponte nasal deprimida, inclinação para cima das fendas palpebrais, anel herniário umbilical mais diástase reto anal, genitália feminina, uma mancha hipocrômica na pele e axila direita.

Os exames complementares foram: Ecocardiograma apresentando persistência do canal arterial mínimo; Ultrassom abdominal normal; Exame de fundo de olho normal. Cromatografia de oligossacarídeos e de sialoligossacarídeos em material de urina foi normal.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico realizado com quatro dias de vida, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 18 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XX,+i(12p)[41]/46,XX[9], num total de 50 células analisadas. O mosaicismo cromossômico detectado na cultura de fibroblastos de pele é típico da Síndrome de Pallister-Killian. A cariotipagem molecular não foi feita devido à insuficiência de material.

De acordo com Schinzel (1991), as características clínicas mais comuns deste diagnóstico com base em relatos de casos incluem dismorfismo craniofacial, anomalias na pigmentação da pele, mãos largas, hipotonia, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e epilepsia, corroborando com nossos resultados.

4.1.6 Caso VI

Figura 15- Heredograma do propósito VI

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 34 anos, pai de 35 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 15). No período antenatal apresentava aumento de translucência nuchal e um cariótipo mosaico de 46,XX/47,XX, i (12)p. Nasceu de parto normal, prolongado, idade gestacional de 35 semanas, peso ao nascimento 2835 g e 46 cm de comprimento e apgar de 1/3. Apresentou anoxia neonatal e teve alta com 55 dias.

O exame físico com dois anos e um mês de vida revelou: peso de 11470 g, comprimento de 79 cm e perímetro cefálico de 43 cm. Evoluiu com hipotonia e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor.

Apresentava hipertelorismo, fissuras palpebrais, sobrancelhas esparsas, macroglossia, fenda palatina, úvula bífida, persistência do canal arterial, defeito septal atrial, hipertensão pulmonar, estrias hipopigmentares, atraso no desenvolvimento, hipoplasia de corpo caloso (Figura 16).

Figura 16- Características clínicas da paciente destacando hipertelorismo, fissuras palpebrais, sobrancelhas esparsas, macroglossia e estrias hipopigmentares

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XX+i(12p) num total de 15 células analisadas (Figura 17). Esse resultado detectado na cultura de fibroblastos de pele é típico da Síndrome de Pallister-Killian (PKS).

Figura 17- Cariograma da paciente mostrando o isocromossomo 12p

Foram analisadas 30 metáfases pela técnica de FISH (da mancha hipocrômica) utilizando a sonda subtelomérica de 12p Cytocell®, observando-se quatro marcações nas células, confirmando a síndrome de Pallister-Killian (PKS) (Figura 18).

Figura 18- Análise FISH de célula da mancha hipocrômica, utilizando sonda subtelomérica de 12p. Quatro sinais vermelhos puderam ser detectados, apontando para a tetrassomia 12p

Foi realizada a técnica de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), do material das manchas da paciente e do material da mucosa oral da mesma, tendo como resultado:

- Kit P070- Dup 12p11 – sonda KBM5A (x 4)
- Kit P036- Dup 12p – sonda SLC6A12 (x 4)

O MLPA também apresentou quatro cópias da região 12p, confirmando a Síndrome de Pallister-Killian, e, como dito anteriormente, essa é uma alternativa mais rápida e economicamente mais viável que outras técnicas moleculares. Constatamos que o material da mucosa oral é muito útil como uma técnica não-invasiva nesses casos.

4.1.7 Caso VII

Figura 19- Heredograma do propósito VII

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 27 anos, pais sadios e não consanguíneos (Figura 19). A mãe relata diabetes gestacional diagnosticada com 30 semanas. Nasceu de parto normal com idade gestacional de 37 semanas, peso 2910 g, 48 cm de comprimento, 35 cm de perímetro cefálico e apgar 6/8. Teve hipoglicemia e

bradicardia. Foi observada alterações faciais dismórficas. Teve apneias com 6 dias de vida e precisou ficar intubada por 1 dia.

O exame físico com dois meses de vida revelou: peso de 4010 g, comprimento de 54,5 cm e perímetro cefálico de 38,5 cm. Apresentava olhos com fendas palpebrais estreitas, com aparente hipertelorismo, filtro convexo, palato alto, orelhas posteriorizadas e estrias hipopigmentares.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele não teve resultado devido a cultura celular não ter sido efetiva. Como alternativa, foi coletado material da mucosa oral da paciente para realização da técnica de MLPA que evidenciou a presença de quatro cópias do braço curto do cromossomo 12, compatível com a tetrassomia desta região cromossômica, responsável pela síndrome de Pallister-Killian.

4.1.8 Caso VIII

Figura 20- Heredograma do propósito VIII

Paciente do sexo masculino, 4^a gestação materna, mãe de 39 anos, pai de 42 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 20). Nasceu de parto cesáreo com idade gestacional de 37 semanas, peso 4110 g, 50,5 cm de comprimento, 36 cm de perímetro cefálico e apgar 8/9. Teve hipoglicemia, icterícia e fratura na clavícula esquerda.

O exame físico com um ano e três meses de vida revelou: peso de 10000 g, comprimento de 77,5 cm e perímetro cefálico de 47 cm. Apresentava fáceis típico, alopecia temporal, hipertelorismo, testa proeminente, filtro longo, sobrancelhas esparsas, base nasal alargada, surdez neurosensorial, comunicação interatrial, hipotonia, convulsões, e manchas hiperocrômicas lineares nos membros (Figura 21).

Figura 21- Características clínicas do paciente destacando alopecia temporal, hipertelorismo, testa proeminente, filtro longo, sobrancelhas esparsas e manchas hiperocrômicas lineares nos membros

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XY sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 46,XY[13]/47,XY,+i(12p)[87] num total de 100 células analisadas. Confirmando assim, mais um caso de Síndrome de Pallister-Killian.

Embora quase universalmente descrita como um diagnóstico grave, com múltiplas anomalias congênitas e graves problemas de desenvolvimento cognitivo, trabalhos recentes descrevem mais variedade no fenótipo. Apesar dessa variabilidade clínica documentada, ainda não há evidência do grau de mosaicismo que afeta o fenótipo e ainda não há descrições completas da composição genética do isocromossomo (Wilkins et al., 2012).

4.1.9 Caso IX

Figura 22- Heredograma do propósito IX

Paciente do sexo masculino, 1ª gestação materna, pais saudáveis e não consanguíneos (Figura 22). Nasceu de parto normal com idade gestacional de 34 semanas, peso 3240 g, 48 cm de comprimento e apgar 5/8. Foi utilizado fórceps de alívio no parto.

O exame físico com dois meses de vida revelou: peso de 3300 g, comprimento de 50,6 cm e perímetro cefálico de 37 cm. Apresentava face peculiar, cabelos ralos, dolicocefalia, fronte ampla, fugidia com enrugamento da pele, discreto hirsutismo na fronte e região lateral da face, sobrancelhas arqueadas e ralas, edema bipalpebral, ptose palpebral e epicantero bilateral, órbitas rasas, fendas palpebrais de inclinação para cima, ponte nasal baixa, nariz bulboso, narinas antevertidas, filtro longo, côncavo e hipoplásico; lábios superiores mais finos que os inferiores; sopro sistólico; hipotonia (Figura 23).

Figura 23- Características clínicas do paciente destacando fronte ampla, sobrancelhas arqueadas e ralas, filtro longo

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 47,XY,+i(12) nas 30 células analisadas, sendo confirmado a Síndrome de Pallister-Killian (PKS).

- **Discussão da Síndrome de Pallister-Killian (PKS)**

A PKS é uma síndrome rara com pouco mais de 200 casos descritos desde os relatos originais de Pallister e colaboradores (1977) e de Teschler-Nicola e Killian (1981). Sendo que a maioria relata casos graves, e as anormalidades mais frequentes são: fácies grosseiro, alopecia, anormalidades oculares, hipotonia, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e displasias pigmentares, várias características compatíveis com nossos

pacientes que podem ser observadas na tabela 1. O conhecimento dos sinais precoces e tardios é importante para solicitar exames adequados.

Tabela 1- Características clínicas dos nossos pacientes com Síndrome de Pallister-Killian

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	CASOS
Fácies grosseiro	8/8
Dismorfismos	8/8
Hipertelorismo	8/8
Alopecia	4/8
Sobrancelhas esparsas	8/8
Filtro longo	8/8
Manchas cutâneas	5/8
Malformações	8/8
ADNPM	2/8
Convulsão	2/8

ADNP- Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor

O espectro de manifestações clínicas na PKS é amplo e inclui anomalias craniofaciais como uma de suas principais características. Não existe uma estimativa da prevalência de PKS uma vez que a expressividade da mesma é variável (Wilkens et al., 2012).

Um terço dos casos relatados na literatura apresenta atraso de crescimento, compatível também com o quadro dos nossos pacientes. Vogel e colaboradores (2009) relataram uma menina de 5 anos de idade, com PKS resultante de mosaicismo por 2 isocromossomos extranumerários, ou hexassomia do 12p. Testes foram feitos com microsatélites em alelos 12p de origem materna de fibroblastos de pele e, resultados sugeriram que a tetrassomia do 12p ocorreu de um acontecimento pré-zigótico em um

evento de disjunção DNA meiose materna. Há casos de anel do cromossomo 12 também, onde o fenótipo depende do tamanho, da estabilidade do anel, da quantidade de eucromatina perdida e da porcentagem do mosaicismo cromossômico (Cormier-Daire et al., 1997).

Sugere-se que não haja compatibilidade com a vida quando há 100% do 12p extranumerário nos dois tecidos, já que não há nenhum relato dessa síndrome ocorrendo somente em mosaico. Sendo a presença do isocromossomo 12p nos afetados pela síndrome descritos como mosaicismo limitado a tecidos, na qual a linhagem celular anormal está confinada aos fibroblastos, na maioria dos casos (Huang et al., 2007).

A princípio não há correlação entre a proporção das células anormais com o iso 12p nos fibroblastos e nos linfócitos. A gravidade da doença, o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e as malformações não parecem ter correlação com essas proporções nos linfócitos e fibroblastos (Smigiel et al., 2008). É por isso que para a suspeita clínica de PKS é fundamental para fazer um diagnóstico (Jamuar et al., 2012).

Há trabalhos que relatam uma região crítica mínima para o fenótipo da PKS e há relatos em que o fenótipo da PKS pode resultar da duplicação ou triplicação de um número muito pequeno de genes críticos no cromossomo 12p (Segel et al., 2006; Hansen et al., 2010; Izumi et al., 2012; Jamuar et al., 2012).

Essa síndrome também pode ser detectada em células da mucosa oral, líquido amniótico, cordão umbilical, medula óssea, diversos tecidos, reforçando a importância dos estudos genéticos de outros tipos de tecidos para um diagnóstico mais fidedigno, uma vez que o cariótipo sanguíneo é normal (Cobben et al., 2013).

Assim, nossos casos corroboram com a literatura tanto nas características clínicas dos pacientes quanto nos resultados laboratoriais (tabela 2). A princípio não há correlação

entre a proporção das células anormais com o iso 12p nos fibroblastos e nos linfócitos. A gravidade da doença, o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e as malformações não parecem ter correlação com essas proporções nos linfócitos e fibroblastos.

Tabela 2- Porcentagem de células com o isocromossomo 12p nos pacientes com Síndrome de Pallister-Killian

PACIENTES	CARIÓTIPO	% DE CÉLULAS COM i(12p)	TECIDO	IDADE
2	47,XX+ i(12p)	100	Pele	1a 5m
3	47,XY+i(12p)/46,XY	80	Pele	1a 10m
4	47,XX+i(12p)/46,XX	50	Pele	10 m
5	47,XX+i(12p)/46,XX	82	Pele	3m 24d
6	47,XX+i(12p)	100	Pele	2a 4m
8	47,XY+i(12p)/46,XY	87	Pele	7m
9	47,XY+i(12p)	100	Pele	< 3a

O diagnóstico da PKS é importante para permitir o aconselhamento genético e para otimizar o atendimento clínico dos pacientes. É importante que os pediatras sejam capazes de reconhecer as características PKS para um diagnóstico precoce.

4.2 Descrição dos casos sem definição diagnóstica

4.2.1 Caso X

Figura 24- Heredograma do propósito X

Paciente do sexo masculino, 4^a gestação materna, mãe de 39 anos, pai de 43 anos, saudáveis e consanguíneos (Figura 24).

Nasceu de parto cesáreo, com idade gestacional de 40 semanas, apgar de 7 e 9. Não chorou, logo apresentou desconforto respiratório e icterícia tardia recebendo alta com 18 dias de vida. Ao nascimento, apresentou o peso de 3880 g, comprimento de 50 cm e perímetro cefálico de 37 cm.

O paciente evoluiu com hipotonia, convulsões e várias internações, devido, inicialmente, a infecção urinária e posteriormente broncopneumonia quando foi internado no Instituto da Criança (ICr). Na ocasião, aos três meses de idade, o exame físico revelou: 4980 g de peso, seu comprimento 53 cm e perímetro cefálico de 40 cm. Como características clínicas apresentava fácies grosseira, assimetria ocular (direito maior que esquerdo), filtro convexo, palato ogival, mamilo extranumerário (dois no lado direito e um no lado esquerdo), criptorquidia bilateral, mãos com agenesia de unha do 5º dedo, pés

com agenesia de unha do 2º ao 5º artelho, presença de uma mancha hiperocrômica na coxa direita e outra mancha avermelhada no tronco esquerdo.

Os exames complementares foram: Ecocardiograma apresentando forame oval patente; Eletroencefalograma normal; Ultrassom abdominal normal; Avaliação oftalmológica normal.

O estudo cromossômico de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XY sendo analisadas um total de 20 células.

A biópsia de pele foi realizada em três ocasiões, não teve sucesso nas duas primeiras culturas e na terceira veio o resultado normal com 46,XY sob análise de 20 células.

Não foi feito o estudo molecular devido à insuficiência de material. Embora o cariótipo de fibroblastos de pele tenha dado normal ainda não descartamos a possibilidade de PKS, uma vez que podem ocorrer diferentes níveis de mosaicismo pigmentar. A duplicação da região crítica do braço curto do cromossomo 12 pode estar presente em outro tecido, pode talvez confinar-se a uma outra região, que não na mancha. Em nosso paciente pode ter ocorrido um pequeno grau de mosaicismo confinado e é plausível que nas partes não coletadas haja um número de células mutadas. Assim, a área da biópsia não garante a presença de alterações, precisando, às vezes, de coleta de mais de uma região para ser identificada a alteração, corroborando com a literatura (Cheung et al., 2007).

- **Relato de casos sem definição diagnóstica**

4.4.2 Caso XI

Figura 25- Heredograma do propósito XI

Paciente do sexo feminino, 1^a gestação materna, mãe de 25 anos, pai de 30 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 25). A mãe relata anemia durante a gestação. Nasceu de parto normal, a termo, peso de 3850 g e comprimento 51 cm.

O exame físico com cinco anos e sete meses de vida revelou: peso 12000 g, comprimento 117 cm e perímetro cefálico de 51 cm. A criança apresentou epilepsia com 4 anos de idade, sendo a 1^a crise após febre de 40 °C com duração de dois minutos, passou a tomar gardenal para conter a convulsão. Apresentava fácies grosseira (semelhante ao pai), cabelos cheios, secos e crespos, hiperplasia gengival, nariz rebaixado, hérnia umbilical e máculas hipo e hiperocrômicas lineares (linhas de Blaschko) em todo o corpo (desde o nascimento).

Aos 13 anos de idade ela apresentou anodontia (falta de 6 dentes permanentes) e estava sem crises convulsivas (Figura 26).

Figura 26- Características clínicas da paciente destacando fácies grosseira

Os exames complementares foram: Ecocardiograma normal e Ultrassom de abdome apresentando dimensões reduzidas e pequena formação cística no rim direito.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi 46,XX[46]/47,XX,+mar[2]/45,X[2], sendo analisadas um total de 50 células. Foram analisadas 11 metáfases pela técnica de FISH, utilizando a sonda “Paint 15 Probe (Q-Biogene)”. Foram analisadas 10 metáfases com 46 cromossomos e uma com 47 cromossomos. Na célula com 47 cromossomos o cromossomo acrocêntrico adicional não marcou com a sonda utilizada.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método de bandamento G foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 20 células.

Acredita-se que o resultado do cariótipo sanguíneo não tenha a ver com as características clínicas apresentadas pela paciente e, embora o cariótipo de fibroblastos de pele tenha dado normal, ainda não descartamos a possibilidade de PKS, uma vez que podem ocorrer diferentes níveis de mosaicismo pigmentar, como visto anteriormente. Há necessidade de continuar a investigação por outros métodos tais como técnica de MLPA,

que não foi feita devido à insuficiência de material e array, como outros autores recomendam (Conlin et al., 2012; Cobben et al., 2013).

4.2.3 Caso XII

Figura 27- Heredograma do propósito XII

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 35 anos, pai de 35 anos, sadios e não consanguíneos (Figura 27). Nasceu de parto cesáreo, a termo, tendo intercorrências como desconforto respiratório e teve alta com 16 dias. Peso de 2960 g ao nascimento, comprimento de 47 cm, perímetro cefálico de 34 cm.

O exame físico com cinco anos e cinco meses de vida revelou: peso 19000 g, comprimento 100 cm e perímetro cefálico 51,5 cm. Apresentava fáceis alongado, hipertelorismo, tinha dificuldade de sucção e deglutição, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, hidronefrose bilateral, cardiopatia, refluxo gastroesofágico grau III e vômito que melhorou com dois anos de idade. Pés tortos congênitos e hiperatividade também faziam parte do quadro clínico. Não possuía manchas, porém devido à suspeita clínica indicou-se o estudo de fibroblastos.

Os exames complementares foram: Eletroencefalograma apresentando ondas lentas, de maior amplitude e ondas pontuadas; Ultrassom de crânio normal; Ecocardiograma demonstrando comunicação interatrial (CIA).

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico realizado com quatro dias de vida, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 46,XX num total de 63 células analisadas.

Não descartamos, nesse caso também, a PKS, uma vez que a região da biópsia pode ter interferência no resultado, assim como outros fatores anteriormente discutidos. Mais estudos são necessários para determinar um diagnóstico (Conlin et al., 2012; Kostanecka et al., 2012; Cobben et al., 2013).

A quantidade de células analisadas variou de acordo com a qualidade do material coletado e de acordo com a qualidade das lâminas preparadas para o estudo.

4.2.4 Caso XIII

Figura 28- Heredograma do propósito XIII

Paciente do sexo feminino, 3^a gestação materna, mãe de 27 anos, pai de 34 anos, saudáveis e consanguíneos (Figura 28). A mãe relata ter laqueação de trompas. O propósito nasceu de parto cesáreo, a termo, com 2900 g, 47 cm de comprimento e teve alta com três dias.

O exame físico com 10 meses e 8 dias de vida revelou: peso 10400 g, comprimento 77 cm e perímetro cefálico de 46 cm. Apresentava fáceis grosseiros; dentes pequenos e opalescentes; filtro longo com lábio superior fino; inclinação dos olhos para cima; nariz bulboso com narinas antevertidas; língua protrusa; atraso de desenvolvimento neuropsicomotor; encurtamento de membros com braquidactilia; pele grosseira (Figura 29).

Figura 29- Características clínicas da paciente destacando filtro longo com lábio superior fino e nariz bulboso

Os exames complementares foram: Ecocardiograma normal; Ultrassom abdominal normal; Raio-X de quadril alargado com sínfise púbica mais ilíaca.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 46,XX num total de 100 células analisadas. Não foram detectadas alterações cromossômicas numéricas ou estruturais. Sugerimos nova coleta de material para a realização de novos exames mais específicos, como descritos acima (Conlin et al., 2012; Kostanecka et al., 2012; Cobben et al., 2013).

4.2.5 Caso XIV

Figura 30- Heredograma do propósito XIV

Paciente do sexo feminino, 1ª gestação materna, mãe de 35 anos, pai de 44 anos, saudáveis e não consanguíneos (Figura 30). O parto foi cesáreo, a termo, peso ao nascimento 3020 g, comprimento de 47 cm.

O exame físico com 14 anos e 7 meses de idade revelou: peso 54000 g, comprimento 148 cm e perímetro cefálico de 52,5 cm. Desde os três meses de idade apresentava convulsão, que durou até os quatro anos de idade. Apresentou manchas pigmentares claras nos braços, abdome, costa e pernas (Figura 31). Teve diversas internações até mais ou menos oito anos de idade devido à hipotermia, desmaio e convulsão. Apresenta dismorfismos, hipoplasia dos dentes incisivos, sindactilia parcial do segundo e terceiro artelho, unhas pequenas, menarca com onze anos de idade.

Figura 31- Características clínicas da paciente destacando dismorfismos faciais e manchas cutâneas nos membros

Os exames complementares foram: Raio-X de crânio, tórax e coluna normal; Ressonância magnética de crânio normal; Ecocardiograma normal; Avaliação Oftalmológica normal; Ultrassom de abdome normal.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 46,XX num total de 51 células analisadas.

As características clínicas são compatíveis com a Incontinência pigmentar, assim, devido à essas características, sugerimos, nesse caso, um estudo molecular mais avançado como o MLPA ou array devido à dificuldade de se encontrar o mosaicismismo nesse tipo de doença (Cho et al., 2009; Conlin et al., 2012; Cobben et al., 2013).

4.2.6 Caso XV

Figura 32- Heredograma do propósito XV

Paciente do sexo feminino, 3^a gestação materna, mãe de 23 anos, pai de 25 anos, saudáveis e consanguíneos (Figura 32). A mãe relata sangramento no primeiro trimestre. Nasceu de parto normal, a termo, peso ao nascimento 3350 g e teve alta com três dias.

O exame físico com um ano e um mês de vida revelou: 8500 g, comprimento 70,5 cm e perímetro cefálico de 43,5 cm. Com 45 dias de vida teve crises convulsivas (no início parcial, lado esquerdo). Faz acompanhamento fonoaudiológico, psicológico e com terapeuta ocupacional na APAE (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais). Apresentava face assimétrica (lado direito maior que lado esquerdo), alopecia frontal, orelha displásica, unha do quarto dedo esquerdo com afilamento distal, implantação anormal do quarto artelho direito, manchas lineares hipo e hiperocrômicas no corpo (acompanha as linhas de Blaschko) (Figura 33) e déficit pômdero-estatural.

Figura 33- Características clínicas da paciente destacando dismorfismos faciais, manchas hipocrômicas e hiperocrômicas acompanhando as linhas de Blaschko

Os exames complementares foram: Eletroencefalograma normal; Ressonância magnética apresentou anaftalmia esquerda, dilatação dos ventrículos laterais, corpo caloso fino; Raio-X de crânio apresentou órbita esquerda maior que a direita; Raio-X de mãos apresentou encurtamento do quarto metacarpo e mão esquerda menor que a direita; Ecocardiograma normal.

O cariótipo de linfócitos de sangue periférico, por bandamento G, foi normal com 46,XX sendo analisadas um total de 15 células.

O cariótipo de fibroblastos de pele pelo mesmo método foi 46,XX num total de 50 células analisadas.

- **Discussão dos casos sem definição diagnóstica**

Apesar de alguns casos terem um padrão distinto de anomalias, permitindo um diagnóstico baseado em manifestações clínicas (tabela 3), sugerimos um exame molecular mais detalhado para que possamos ter um diagnóstico preciso para o paciente. Assim, mesmo que o resultado para o cariótipo de fibroblastos tenha sido normal, destacamos a importância de mais estudos citogenômicos, envolvendo múltiplos tecidos, para facilitar o aconselhamento genético e a correlação cariótipo-fenótipo (Conlin et al., 2012; Sarma, 2012; Vreeburg; van Steensel, 2012; Cobben et al., 2013).

Tabela 3- Características clínicas dos pacientes sem definição diagnóstica

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	CASOS
Fácies grosseiro	6/6
Dismorfismos	6/6
Hipertelorismo	6/6
Sobrancelhas esparsas	5/6
Filtro longo	4/6
Mamilo supranumerário	1/6
Manchas cutâneas	2/6
Malformações	6/6
ADNPM	2/6
Convulsão	4/6

ADNP- Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor

Diferentes técnicas de citogenética molecular também podem ser utilizadas para o diagnóstico de mosaicismo pigmentar quando as técnicas convencionais não dão

resultados. Além da técnica de FISH e MLPA, há também a triagem por array que pode ser outra alternativa de investigação molecular para esses casos sem definição diagnóstica (Frank, Happle, 2007; Cho et al., 2009; Happle, 2010; Lindstrand et al., 2010; Conlin et al., 2012; Cobben et al., 2013).

Outros motivos para um resultado normal podem ser: a amostra coletada ter somente células normais; seleção contra as células anormais durante o cultivo celular; e/ou alguma mutação não detectável citogeneticamente, como uma mutação em um único gene.

Sugerimos, então, devido à soma dos achados clínicos desses pacientes uma nova coleta de outras regiões ou outros tecidos, para fazermos novos exames e testes moleculares, uma vez que o mosaicismo pode ser muito abrangente, sendo a distribuição das diferentes linhagens celulares, muito variável (Paskulin et al., 2011; Conlin et al., 2012; Cobben et al., 2013).

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- A padronização e implantação de um protocolo para cultura de fibroblastos em pele humana, oriunda de manchas cutâneas, foi realizada com sucesso. Evidenciamos que em pacientes portadores de manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações o estudo citogenômico de fibroblastos de pele é muito útil para investigação etiológica.
- A inclusão da técnica de MLPA da mucosa oral constitui uma ferramenta alternativa, não invasiva, para o diagnóstico da Síndrome de Pallister-Killian.
- O estudo citogenômico de fibroblastos e/ou mucosa oral é útil no diagnóstico etiológico dos pacientes com manchas cutâneas associadas ao atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou malformações proporcionando o aconselhamento genético adequado.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

Andrieux J, Sheth F. Comparative genomic hybridization array study and its utility in detection of constitutional and acquired anomalies. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47(10): 779-91.

Baglaj M, King J, Carachi R. Pallister-Killian syndrome: a report of 2 cases and review of its surgical aspects. *J Pediatr Surg.* 2008; 43(6): 1218-21.

Butt FM, Moshi JR, Owibingire S, Chindia ML. Xeroderma pigmentosum: a review and case series. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010; 38(7): 534-7.

Bygum A, Petkov Y, Graakjaer J, Jensen UB, Fagerberg C. Phylloid Hypermelanosis in a Child with Psychomotor Delay, Cicatricial Alopecia, Hearing Loss and Polythelia. *Acta Derm Venereol.* 2011.

Chauffaille MLLF. Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. *Rev Bras hematol hemoter.* 2005; 27(4): 247-252.

Cheung SW, Shaw, CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Pursley A, Li J, Erickson R, Gropman AL, Miller DT, Seashore MR, Summers AM, Stankiewicz P, Chinault AC, Lupski JR, Beaudet AL, Sutton VR. Microarray-Based CGH Detects

Chromosomal Mosaicism Not Revealed by Conventional Cytogenetics. *Am J Med Genet A*, 2007; 143A: 1679–1686.

Cho EH, Bo Ya Na MD, Park MS, Cho JH, Kang YS, M.T. Comparing Two Diagnostic Laboratory Tests for Several Microdeletions Causing Mental Retardation Syndromes: Multiplex Ligation-Dependent Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization. *Diagnostic Genetics*. 2009.

Cobben JM, Engelen M, Polstra A. Array CGH on unstimulated blood does not detect all cases of Pallister–Killian syndrome: Buccal Smear Analysis should remain the diagnostic procedure of first choice. *Am J Med Genet Part A*. 2013; 161A:1517–1519.

Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*. 2006; 38(4): 122-7.

Conlin LK, Kaur M, Izumi K, Campbell L, Wilkens A, Clark D, Deardorff MA, Zackai EH, Pallister P, Hakonarson H, Spinner NB, Krantz ID. Utility of SNP arrays in detecting, quantifying, and determining meiotic origin of tetrasomy 12p in blood from individuals with Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(12):3046-53.

Cormier-Daire V, Merrer ML, Gigarel N, Morichon N, Prieur M, Lyonnet S, Vekemans M, Munnich A. Prezygotic Origin of the Isochromosome 12p in Pallister-Killian Syndrome. *Am J Med Genet.* 1997; 69: 166–168.

Dhar SU, Robbins-Furman P, Levy ML, Patel A, Scaglia F. Tetrasomy 13q mosaicism associated with phylloid hypomelanosis and precocious puberty. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(5): 993-6.

Franco LM, Goldstein J, Prose N, Selim MA, Tirado CA, Coale MM, McDonald MT. Incontinentia pigmenti in a boy with XXY mosaicism detected by fluorescence in situ hybridization. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55: 136-8.

Frank J, Happle R. Cutaneous mosaicism: right before our eyes. *The Journal of Clinical Investigation.* 2007; 117(5): 1216-1219.

Gardner RJM, Dockery HE, Fitzgerald PH, Parfitt RG, Romain DR, Scobie N, Shaw RL, Tumewu P, WatT J. Mosaicism with a normal cell line and an autosomal structural rearrangement. *J Med Genet.* 1994; 31: 108-114.

Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M, Langmann T, Singer S, Klingseisen L, Schneider- Brachert W, Toll A, Real FX, Landthaler M, Hafner C. Postzygotic *HRAS* and *KRAS* mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nature Genetics.* 2012; 44(7): 783-787.

Golabi M, James AW, Good WV, Cotter PD. Tissue-Limited Mosaicism for Monosomy

13. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A: 2634-2639.

Goldberg I, Sprecher E. Patterned disorders in dermatology. *Clin Dermatol*. 2011;

29(5):498-503.

Hansen LK, Bygum A, Krogh LN. Infantile spasms and pigmentary mosaicism.

Epilepsia. 2010; 51(7):1317–1318.

Happle R. Mosaicism in Human Skin Understanding the Patterns and Mechanisms. *Arch*

Dermatol. 1993; 129: 1460-1470.

Happle R. Phylloid hypermelanosis: an unusual form of pigmentary mosaicism.

Dermatol. 2010; 220(2): 183-5.

Horn D, Happle R, Neitzel H, Kunze J. Pigmentary Mosaicism of the Hyperpigmented

Type in Two Half-Brothers. *Am J Med Genet*. 2002; 112: 65–69.

Horovitz DD, Llerena JRJC, Mattos, RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil:

panorama atual. *Cad. Saúde Pública*. 2005; 21(4): 1055-1064.

Huang XL, Michelena IM, Leon E, Maher TA, McClure R, Milunsky A. Pallister–Killian syndrome: tetrasomy of 12pter/12p11.22 in a boy with an analphoid, inverted duplicated marker chromosome. *Clin Genet*. 2007; 72: 434–440.

ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 2009.

Izumi K, Conlin LK, Berrodin D, Fincher C, Wilkens A, Haldeman-Englert C, Saitta SC, Zackai EH, Spinner NB, Krantz ID. Duplication 12p and Pallister–Killian syndrome: A case report and review of the literature toward defining a Pallister–Killian syndrome minimal critical region. *Am J Med Genet*. 2012; 158A: 3033–3045.

Jamuar S, Lai A, Unger S, Nishimura G. Clinical and radiological findings in Pallister–Killian syndrome. 2012; 55:167–172.

Kocaturk E, Zemheri E, Kavala M, Aktas S, Sarigul S, Sudogan S. Two cases of linear epidermolytic hyperkeratosis: therapeutic challenge with acitretin. *Eur J Dermatol*. 2010; 20(3): 404-5.

Kostanecka A, Close LB, Izumi K, Krantz ID, Pipan M. Developmental and behavioral characteristics of individuals with Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(12):3018-25.

Kuster W, König A. Hypomelanosis of Ito: No Entity, but a Cutaneous Sign of Mosaicism. *Am J Med Genet.* 1999; 85: 346–350.

Liberati M, Melchiorre K, D'Emilio I, Guanciali-franchi PE, Iezzi I, Rotmensch S, Celentano C. Fetal facial profile in Pallister-Killian syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2008; 23(1): 15-7.

Lindstrand A, Schoumans J, Gustavsson P, Hanemaaijer N, Malmgren H, Blennow E. Improves structural characterization of chromosomal breakpoints using resolution custom array-CGH. *Clin Genet.* 2010; 77(6): 552-62.

Lipsker M, Flory E, Wiesel ML, Hanau, H. Between Light and Dark, the Chimera Comes Out. *Arch Dermatol.* 2008; 144(3): 327-330.

Lombillo VA, Sybert VP. Mosaicismo na pigmentação cutânea. *Curr Opin Pediatr* 2005.

Lumbroso S, Paris F, Sultan C. Activating Gs-alpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European collaborative study. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2004; 89: 2107-2113.

Muller FB, Huber M, Kinaciyan T, Hausser I, Schaffrath C, Krieg T, Hohl D, Korge BP, Arin MJ. A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis. *Hum. Molec. Genet.* 2006; 15: 1133-1141.

Niessen RC, Jonkman MF, Muis N, Hordijk R, Essen AJV. Pigmentary Mosaicism Following the Lines of Blaschko in a Girl with a Double Aneuploidy Mosaicism: (47,XX,+7/45,X). *Am J Med Genet.* 2005; 137A: 313–322.

Nussbaum, RL. *Thompson & Thompson – Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM; papa MIM):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Ohashi H, Tsukahara M, Murano I, Naritomi K, Nishioka K, Miyake S, Kajii T. Pigmentary dysplasias and chromosomal mosaicism: Report of 9 cases. *Am J Med Genet.* 2005; 43(4): 716-721.

Oiso N, Tsuruta D, Imanishi H, Sayasa H, Narita T, Kobayashi H, Ikegami H, Kawada A. Phylloid Hypermelanosis and Melanocytic Nevi with Aggregated and Disfigured Melanosomes: Causal Relationship between Phylloid Pigment Distribution and Chromosome 13 Abnormalities. *Dermatol.* 2010; 220: 169–172.

Pagon RA, Hall JG, Davenport SLH, Aase J, Norwood TH, Norwood HW. Abnormal Skin Fibroblast Cytogenetics in Four Dysmorphic Patients with Normal Lymphocyte Chromosomes. *Am J Hum Genet.* 1979; 31: 54-61.

Paskulin GA, Lorenzen MB, Rosa RFM, Graziadio C, Zen G. Importância da análise cromossômica dos fibroblastos em casos suspeitos de mosaicismo: experiência de um serviço de Genética Clínica. *Rev Paul Pediatr.* 2011; 29(1): 73-9.

Peltomaki P, Knuutila S, Ritvanen A, Kaitila I, de la Chapelle A. Pallister-Killian syndrome: cytogenetic and molecular studies. *Clin. Genet.* 1987; 31: 399-405.

Rey RA, Venara M, Coutant R, Trabut JB, Rouleau S, Lahlou N, Sultan C, Limal JM, Picard JY, Lumbroso S. Unexpected mosaicism of R201H-GNAS1 mutant-bearing cells in the testes underlie macro-orchidism without sexual precocity in McCune–Albright syndrome. *Human Molecular Genetics.* 2006; 15(24): 3538–3543.

Rooney DE. *Human Cytogenetics: constitutional analysis.* 3a ed. Oxford: University Press, 2001.

Ross R, Digiovanna JJ, Capaldi L, Argenyi Z, Fleckman P, Robinson-bostom L. Histopathologic characterization of epidermolytic hyperkeratosis: a systematic review of

histology from the National Registry for Ichthyosis and Related Skin Disorders. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 59(1): 86-90.

Röthlisberger B, Kotzot D. Recurrence risk in de novo structural chromosomal rearrangements. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A(15): 1708-14.

Sallum ACR, Leonhardt FD, Cervantes O, Abrahão M, Yazaki RK. Hipertireoidismo Relacionado à Síndrome de McCune Albright: Relato de Dois Casos e Revisão da Literatura. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(3): 556-561.

Sánchez BM, Muiños EL, González MC, Meléndez GM. Localized hypertrichosis and pigmentary mosaicism of Ito (hypomelanosis of Ito). *An Pediatr (Barc)*. 2008; 68(3): 307-9.

Sarma N. Pigmentary Nevi on Face Have Unique Patterns and Implications: The Concept of Blaschko's Lines for Pigmentary Nevi. *Indian J Dermatol*. 2012; 57(1): 30–34.

Segel R, Peter I, Demmer LA, Cowan JM, Hoffman JD, Bianchi DW. The natural history of trisomy 12p. *Am J Med Genet*. 2006; 140A: 695–703.

Schinzel A. Tetrasomy 12p (Pallister-Killian syndrome). *J Med Genet.* 1991; 28(2): 122-5.

Shali W, He'lias C, Fohrer C, Struski S, Gervais C, Falkenrodt A, Leymarie V, Lioure B, Raby P, Herbrecht R, Lessard M. Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2006; 168: 133–145.

Shamdeen A, Meyer S, Gottschling S, Oehl-jaschkowitz B, Gortner L, Shamdeen MG. Pallister-Killian Syndrome (PKS) as a Cause of Mental Retardation. *Klin Padiatr.* 2009; 221(2): 97-9.

Sharkey FH, Maher E, Fitzpatrick DR. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child.* 2005; 90: 1264-1269.

Shobha N, Taly AB, Sinha S, Arunodaya GR, Srikanth SG. Neurological pictures, Hypomelanosis of Ito. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77(7): 873.

Smigiel R, Pilch J, Makowska I, Busza H, Slezak R, Sasiadek MM. The Pallister-Killian syndrome in a child with rare karyotype- a diagnostic problem. *Eur J Pedriatr.* 2008; 167: 1063-1065.

Stalker HJ, Gray BA, Bent-williams A, Zori RT. High cognitive functioning and behavioral phenotype in Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet.* 2006; 140A: 1950-1954.

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; 34(7): 823-9.

Treat J. Patterned pigmentation in children. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57(5):1121-9.

Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts, RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet.* 2010; 42: 406-409.

Vergheze S, Newlin A, Miller M, Burton BK. Mosaic Trisomy 7 in a Patient With Pigmentary Abnormalities. *Am J Med Genet.* 1999; 87: 371–374.

Vogel I, Lyngbye T, Nielsen A, Pedersen S, Hertz JM. Pallister-Killian syndrome in a girl with mild developmental delay and mosaicism for hexasomy 12p. *Am J Med Genet.* 2009; 149A(3): 510-4.

Vreeburg M, van Steensel MAM. Genodermatoses caused by genetic mosaicism. *Eur J Pediatr*. 2012; 171:1725–1735.

Wilkens A, Liu H, Park K, Campbell LB, Jackson M, Kostanecka A, Pipan M, Izumi K, Pallister P, Krantz ID. Novel clinical manifestations in Pallister–Killian syndrome: Comprehensive evaluation of 59 affected individuals and review of previously reported cases. *Am J Med Genet Part A*. 2012; 158A:3002–3017.

Woods CG, Bankier A, Curry J, Sheffield LJ, Slaney SF, Smith K, Voullaire L, Wellesley D. Asymmetry and skin pigmentary anomalies in chromosome mosaicism. *J Med Genet*. 1994; 31: 694-701.

Yeung A, Francis D, Giouzeppos O, Amor DJ. Pallister–Killian syndrome caused by mosaicism for a supernumerary ring chromosome 12p. *Am J Med Genet*. 2009; 149A: 505–509.

Yousoufian H, Pyeritz RE. Mechanism and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* 2002; 3:748- 758.

Zen PRG, Pinto LLC, Graziadio C, Pereira VB, Paskulin GA. Association of microcephaly and café-au-lait spots in a patient with ring chromosome 12 syndrome. *Clinical Dysmorphology*. 2005; 14(3): 141-143.