

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Genética  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Investigação da deleção recorrente de *IKBKG* em  
pacientes com Incontinência Pigmentar e achados clínicos  
associados**

**Luiza Monteavaro Mariath**

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccini

Coorientadora: Dra. Ana Elisa Kiszewski Bau

Dissertação

Porto Alegre  
Janeiro de 2016

Luiza Monteavaro Mariath

**Investigação da deleção recorrente de *IKBKG* em  
pacientes com Incontinência Pigmentar e achados clínicos  
associados**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da UFRGS como um dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüller-Faccini

Coorientadora: Dra. Ana Elisa Kiszewski Bau

Porto Alegre

Janeiro de 2016

## **Local de Execução e Instituições Financiadoras**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução, pertencente ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O estudo recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Banca Examinadora**

Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize

Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Dr. Hiram Larangeira de Almeida Junior

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Membro suplente da banca examinadora

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dra. Vânia Oliveira de Carvalho

Membro suplente da banca examinadora

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”*

Antoine de Saint-Exupéry

## AGRADECIMENTOS

À Lavínia, pelo exemplo de orientadora, de profissional e, principalmente, de pessoa que é. Pela oportunidade de realizar esse trabalho com a sua orientação e apoio. Por ter acolhido a minha angústia em um momento importante e a transformado em novo ânimo, mostrando que sempre há um caminho.

À Ana Elisa, pela oportunidade de conviver com uma profissional excepcional. Por sempre estar disposta a explicar e resolver minhas dúvidas. Pela confiança em me inserir no estudo da Incontinência Pigmentar e pela oportunidade de trabalhar com as Genodermatoses.

Ao professor Claiton, por estar presente na hora certa e no local certo quando, em uma conversa informal com a Lavínia, foi o primeiro a iluminar a parceria com a Ana.

À professora Maria Teresa por ter me acompanhado em um momento importante do mestrado.

Ao Elmo, por todas as respostas às minhas frequentes perguntas e por estar sempre disposto a resolver os problemas.

À banca examinadora pela disponibilidade e pelas proveitosas sugestões à dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Genética Médica, o nosso Lab 113, pela maravilhosa amizade. Por terem me dado apoio nos momentos em que nada funcionava e por terem festejado comigo quando as bandas apareciam nos géis de agarose. Pelos momentos de descontração e pelos momentos de trabalho. Por serem a melhor companhia diária que eu poderia querer durante esses dois anos de mestrado.

Aos amigos de sempre, por me propiciarem ótimos momentos de diversão e afeto. Pelos barzinhos, pelos jogos e pelas conversas. Por tornarem minha vida mais feliz.

Aos meus avós, Annita, Ramon, Marisa e Ênio (em memória), pelo amor, pelo exemplo, pelas conversas, pelos churrascos de domingo, pela torcida de sempre e por serem a minha referência. Os levo sempre comigo.

À Vida Canina, minha cachorrinha, pela companhia fiel.

Ao Hélio, por viver comigo cada momento. Por falar a frase certa na hora certa. Por me fazer muito feliz. Pelo abraço, pelo carinho, pelas risadas e pelo amor infinito. Por ser unicamente quem ele é. Por ser o amor da minha vida.

Aos meus pais, José Luiz e Ana Marta, e aos meus irmãos, Gustavo e Felipe, por serem a minha família. Por entenderem os dias de angústia e as madrugadas de estudo. Pelo colo nos dias ruins e por vibrarem com a minha felicidade. Por serem o meu porto seguro. Pelo amor incondicional.

## RESUMO

A Incontinência Pigmentar (IP) é uma genodermatose multissistêmica rara caracterizada por diferentes manifestações clínicas que incluem anormalidades de pele, dentes, cabelos, unhas, olhos e sistema nervoso central. A doença tem um padrão de herança ligado ao X dominante, com letalidade no sexo masculino. A IP é causada por mutações no gene *IKBKG*, que codifica a subunidade regulatória de um complexo necessário para ativação do fator nuclear kB (NF-kB), envolvido em diferentes funções fisiológicas e patológicas essenciais, incluindo a sobrevivência celular. Cerca de 70-80% dos pacientes com IP carregam um rearranjo recorrente no locus de *IKBKG*: a deleção dos éxons 4-10 do gene (*IKBKGdel*). O objetivo do presente estudo é investigar em uma série de casos de IP a prevalência da deleção recorrente, os achados clínicos associados e as histórias genéticas familiares. O estudo molecular incluiu 36 indivíduos, sendo 23 pacientes diagnosticados com IP (11 casos-índice e 12 familiares) e mais 13 familiares não-afetados. A prevalência da deleção *IKBKGdel* na amostra (73%) está de acordo com o relatado na literatura, indicando que, independente da origem étnica, essa é a principal mutação em *IKBKG*. As manifestações clínicas dos pacientes estão de acordo ao descrito em estudos prévios e apontam a importância de avaliações específicas que visem aos principais sinais da IP. A alta variabilidade clínica familiar indica uma ausência de correlação genótipo-fenótipo e sugere que outros fatores devem desenvolver um papel importante para a severidade da doença. Nós demonstramos, pela primeira vez, um desvio da proporção esperada pela segregação mendeliana de meninos:meninas e meninas afetadas:não-afetadas nos casos familiares, indicando uma aparente transmissão preferencial do alelo *IKBKG* mutado. Estudos adicionais serão importantes para comprovar esse achado. Esse é o primeiro estudo genético em IP realizado no Brasil e contribui para a compreensão das bases genética e clínica envolvidas.

## ABSTRACT

Incontinentia Pigmenti (IP) is a rare multisystem genodermatosis characterized by several clinical manifestations, including abnormalities of skin, teeth, hair, nail, eyes and central nervous system. The disease is X-linked dominant and lethal in males. IP occurs due to mutations in *IKBKG* gene, which encodes the regulatory subunit of a complex required for nuclear factor kB (NF-kB) activation, involved in many essential physiological and pathologic functions, including cell survival. Around 70-80% of IP patients carry a recurrent rearrangement in *IKBKG* locus: the exon 4-10 deletion (*IKBKGdel*). Our aim was to investigate in a case series of IP the recurrent deletion prevalence, the associated clinical findings and the familial genetic histories. The molecular study included 36 individuals, being 23 IP patients (11 index-cases and 12 relatives) and 13 non-affected relatives. The *IKBKGdel* prevalence in our sample (73%) is in accordance to that reported in literature, indicating that, irrespectively of ethnical origin, this is the major mutation in *IKBKG*. The clinical manifestations from our IP patients are consistent to those described in previous studies and point out the importance of a specific examination looking for the most prevalent IP signs. The high observed clinical intrafamilial variability indicates a lack of genotype-phenotype correlation and suggests that other factors might play an important role to disease's severity. We show, in first instance, a deviation in the expected mendelian proportion of male:female ratio and, among female, the affected:non-affected ratio in familial cases, indicating an apparent preferential transmission of the mutated *IKBKG* allele. Additional studies are important to verify this finding. This is the first Brazilian genetic study in IP and it contributes to the understanding of the genetic and clinical bases involved.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Genodermatoses .....	13
1.2. Incontinência Pigmentar .....	14
1.2.1. Características clínicas: alterações cutâneas .....	14
1.2.2. Características clínicas: alterações oftalmológicas e neurológicas .....	16
1.2.3. Características clínicas: alterações dentais e orais .....	17
1.2.4. Características clínicas: alterações de cabelo, unhas e mamas .....	18
1.3. Critérios de diagnóstico de Incontinência Pigmentar .....	18
1.4. O gene <i>IKBKG</i> e a Incontinência Pigmentar .....	20
1.4.1. O papel de <i>IKBKG</i> na via de sinalização de NF- $\kappa$ B: consequência das mutações .....	21
1.4.2. A organização genômica de <i>IKBKG</i> .....	23
1.4.3. Mutações em <i>IKBKG</i> .....	24
1.5. A deleção recorrente dos éxons 4-10 de <i>IKBKG</i> .....	25
1.5.1. A detecção da deleção recorrente de <i>IKBKG</i> .....	27
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos Específicos .....	31
<b>4. CAPÍTULO I: A 23-case series in Incontinentia Pigmenti: the recurrent deletion, the clinical findings and new insights .....</b>	<b>32</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>50</b>

**7. REFERÊNCIAS .....51**

**8. ANEXOS .....55**

8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Esclarecido

8.2. Anexo: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATM – Proteína quinase *Ataxia Telangiectasia Mutated*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- EDA-ID - Displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência severa (*Ectodermal Dysplasia, Anhidrotic, with severe Immunodeficiency*)
- G6PD – Gene *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*
- IκB – Inibidor do kappa B (*Inhibitor of the κappa B*)
- IKBKG* - Gene *Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Gamma*
- IKBKGdel* – Deleção recorrente dos éxons 4-10 do gene *IKBKG*
- IKBKGP* – Pseudogene *Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Gamma pseudogene*
- IKBKGPdel* – Deleção dos éxons 4-10 do pseudogene *IKBKGP*
- IKK – Complexo quinase do inibidor do kappa B (*Inhibitor of the KappaB (IκB) Kinase complex*)
- IL-1 – Citocina Interleucina-1 (*Interleukin-1*)
- IP – Incontinência Pigmentar (*Incontinentia Pigmenti*)
- Kb – quilobase (*kilobase*; equivalente a 1000 pares de bases)
- LCR – Repetição de baixo número de cópias (*Low-Copy-Repeat*)
- LINEs – Elementos intercalares longos (*Long Interspersed Elements*)
- MER67B – Repetições *Medium Reiterated 67B*
- MER67Bdup – Duplicação da região entre as duas repetições MER67B
- NAHR – Recombinação homóloga não-alélica (*nonallelic homologous recombination*)
- NEMO* – Gene Modulador Essencial do Fator Nuclear κB (*Nuclear factor kappa B Essential Modulator*), também chamado *IKBKG*
- NEMO/IKKγ – Subunidade regulatória do complexo IKK codificada por *IKBKG/NEMO*
- NF-κB – Fator Nuclear kappa B (*Nuclear factor κappa B*)
- Pb – Par(es) de base(s)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- SINEs - Elementos intercalares curtos (*Short Interspersed Elements*)
- SNC – Sistema Nervoso Central (CNS – *Central Nervous System*)
- TNFα – Proteína de sinalização *Tumor Necrosis Factor-α*

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Critérios de Diagnóstico para IP de acordo com Landy e Donnai (1993) e atualizações de Minic, Trpinac e Obradovic (2014). **(Página 20)**

**Figura 1.** Principais características clínicas de pacientes com IP. **(Página 16)**

**Figura 2.** Representação esquemática da atuação de NEMO/IKK $\gamma$  na via de NF-kB. **(Página 22)**

**Figura 3.** Representação da estrutura genômica no locus da IP. **(Página 23)**

**Figura 4.** Esquema da região codificante de *IKBKG* com as mutações de ponto e pequenas *indel* já descritas em pacientes com IP. **(Página 25)**

**Figura 5.** Exemplo de rearranjo entre L1 e L2 levando ao alelo *IKBKG* patogênico. **(Página 27)**

**Figura 6.** Locus de *IKBKG/IKBKGP*: *primers* e fragmentos esperados pelas técnicas de PCR para detecção da deleção recorrente dos éxons 4-10 do gene/pseudogene. **(Página 29)**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Genodermatoses

Genodermatose é o nome dado às doenças de pele hereditárias, um amplo grupo de anormalidades dermatológicas causadas por mutações genéticas. Na pele, as complexas interações e a comunicação intercelular ocorrem graças à ação de moléculas específicas com diferentes propriedades, que são expressas por uma variedade de tipos celulares os quais compõem a pele (Destefano e Christiano, 2014). Uma única mutação em uma dessas moléculas pode romper toda a organização e função dessas redes essenciais. Assim, nas genodermatoses tais propriedades costumam estar comprometidas, levando à separação das células (formando bolhas) ou ao aumento do *turnover* celular com ou sem acúmulo de estrato córneo (formando ceratoses), bem como a outros fenótipos característicos desse grupo de doenças (Sybert, 2010; Destefano e Christiano, 2014).

Embora sejam numerosas (em torno de 300), as genodermatoses são bastante raras (Sybert, 2010). Usualmente manifestam-se ao nascimento ou no início da vida. Em muitos casos, podem ter acometimento multissistêmico e, em determinadas situações, estão associadas a um aumento de morbidade e mortalidade (Reyes e Eisen, 2010; Babu *et al.*, 2015).

Logo após o Projeto do Genoma Humano, acreditava-se que as bases genéticas da maioria das genodermatoses haviam sido elucidadas (Irvine e Mclean, 2003). Entretanto, desde lá, continuamente uma gama de novos genes e classes de mutações têm sido descobertos em diferentes genodermatoses (Leech e Moss, 2007). A maior parte das mutações identificadas possui consequências profundas, o que pode ser evidenciado no número de doenças da pele herdadas de uma maneira dominante (Sybert, 2010; Destefano e Christiano, 2014).

A identificação de genes e mutações causais às diferentes genodermatoses colabora para o entendimento das correlações genótipo-fenótipo existentes e é essencial para o diagnóstico pré-natal baseado em DNA (Irvine e Mclean, 2003; Leech e Moss, 2007). As novas descobertas genéticas têm sido importantes por demonstrarem o papel de muitas moléculas e de

interações gênicas no contexto das doenças cutâneas hereditárias (Destefano e Christiano, 2014).

## **1.2. Incontinência Pigmentar**

A Incontinência Pigmentar (IP; OMIM #308300), também chamada de Síndrome de Bloch-Sulzberger, é uma genodermatose multissistêmica rara com prevalência estimada de 0,7/100.000 (Orphanet, 2013). A IP se manifesta principalmente em lesões cutâneas, mas também em outros tecidos neuroectodérmicos, afetando dentes, cabelos, unhas, olhos e sistema nervoso central (SNC) (Landy e Donnai, 1993). A doença tem um padrão de herança dominante ligado ao X e ocorre quase que exclusivamente em meninas, sendo letal no sexo masculino. Entretanto, meninos com IP que apresentam mosaïcismo somático ou um diagnóstico concomitante de síndrome de Klinefelter (XXY), podem sobreviver (Aradhya, Courtois, *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2014).

### *1.2.1. Características clínicas: alterações cutâneas*

As anormalidades cutâneas ocorrem em quase 100% dos pacientes e são as primeiras características a se manifestarem, iniciando no período neonatal e podendo persistir até a vida adulta (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014; Swinney, Han e Karth, 2015). As lesões se desenvolvem em quatro diferentes estágios (Figura 1A-D), que ocorrem progressivamente e, em geral, de forma sucessiva, embora a sobreposição de estágios também ocorra (Scheuerle e Ursini, 1993; Poziomczyk *et al.*, 2014). O início do aparecimento, a duração e a sobreposição dos estágios cutâneos da IP variam entre os pacientes; além disso, não são todos os pacientes que apresentam os quatro estágios (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014).

O primeiro estágio, conhecido como vesicular, se apresenta ao nascimento ou logo após e ocorre em 90% dos pacientes. Ele é caracterizado por eritema, vesículas e pústulas que seguem as linhas de Blaschko (Figura 1A). As lesões ocorrem principalmente nas extremidades, mas também podem ser vistas no tronco, na cabeça e no pescoço (Ehrenreich *et al.*, 2007; Poziomczyk *et al.*, 2014; Swinney, Han e Karth, 2015). O segundo estágio,

chamado de verrucoso, ocorre nas primeiras semanas ou meses de vida, em cerca de 70% dos pacientes e é caracterizado pela presença de placas e pápulas verrucosas linearmente organizadas sob as linhas de Blaschko (Figura 1B). As extremidades são as mais envolvidas nesse estágio (Poziomczyk *et al.*, 2014; Swinney, Han e Karth, 2015).

O terceiro estágio, chamado hiperpigmentado, é o mais frequente, ocorrendo em 98% dos pacientes. Ele se apresenta durante a infância e a adolescência, mas usualmente desaparece na vida adulta. Essa fase é caracterizada pelo aparecimento de lesões lineares com pigmentação amarronzada (Figura 1C). O tronco e as extremidades são as regiões mais afetadas pelas lesões (Poziomczyk *et al.*, 2014; Swinney, Han e Karth, 2015). O quarto estágio, chamado de atrófico ou hipopigmentado, se desenvolve durante a adolescência, persiste durante a vida adulta e pode ser permanente. Ele é caracterizado por áreas irregulares de hipopigmentação e atrofia cutânea (Figura 1D). Na literatura, estima-se que ocorra em cerca de 28% dos pacientes (Swinney, Han e Karth, 2015). Entretanto, devido à sutileza das lesões atróficas, é provável que essa fase tenha sido sub-relatada em estudos passados e que, na verdade, ocorra na maior parte dos pacientes (Poziomczyk *et al.*, 2014).



**Figura 1. Principais características clínicas de pacientes com IP.** (A) estágio cutâneo 1: fase vesicular; (B) estágio cutâneo 2: fase verrucosa; (C) estágio cutâneo 3: fase hiperpigmentada; (D) estágio cutâneo 4: fase hipopigmentada; (E) alterações dentais: malformação dos dentes e agenesia dental; (F) alopecia em vértice; (G) Distrofia das unhas com estrias longitudinais. Fotos de A-F obtidas da revisão de Poziomczyk *et al.* (2014) provenientes de alguns dos pacientes incluídos no presente estudo; foto G retirada de Radj-Rabia *et al.* (2011).

### 1.2.2. Características clínicas: alterações oftalmológicas e neurológicas

Diversos estudos retrospectivos apontam frequências inconstantes de achados oftalmológicos em pacientes com IP, variando de 16 a 77% (Holmstrom e Thoren, 2000; Hadj-Rabia *et al.*, 2003; Phan, Wargon e Turner, 2005; Minic *et al.*, 2010; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Uma vez que as alterações oculares estão entre os sinais mais comuns na IP e por serem altamente debilitantes, é orientado um exame oftalmológico em pacientes com suspeita da doença (Swinney, Han e Karth, 2015). Os defeitos oculares são, usualmente, divididos em dois grupos: os que afetam a retina e os que não afetam a retina. Uma recente meta-análise (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014)



apontou frequências similares para os dois tipos de anomalias (53 e 47%, os que afetam e os que não afetam a retina, respectivamente). Os pacientes com IP podem apresentar diferentes combinações de alterações oftalmológicas, sendo em média encontradas cerca de duas anomalias oculares em cada um deles (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Usualmente a manifestação ocorre unilateralmente ou, quando de forma bilateral, um olho é mais afetado que outro (Poziomczyk *et al.*, 2014).

As anomalias de SNC são as complicações mais sérias e a principal causa de morte na IP (Scheuerle e Ursini, 1993; Swinney, Han e Karth, 2015). Estima-se que 13-35% dos pacientes tenham alguma anormalidade neurológica, sendo as mais frequentes convulsões, comprometimento motor e retardo mental (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Nota-se que mais de 90% dos defeitos de SNC aparecem antes dos dois anos de idade em pacientes com IP (Swinney, Han e Karth, 2015). Sugere-se a existência de uma correlação entre a severidade dos achados oftalmológicos e o fenótipo neurológico, embora essa relação ainda não esteja bem elucidada (Berlin, Paller e Chan, 2002; Poziomczyk *et al.*, 2014).

### *1.2.3. Características clínicas: alterações dentais e orais*

Anormalidades dentais são relatadas com diferentes frequências em coortes de pacientes com IP, variando de 31 a 92% (Fusco *et al.*, 2004; Hadj-Rabia *et al.*, 2011; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Essa alta variabilidade pode estar indicando a existência de casos em que os defeitos dentais passam despercebidos devido à ausência de uma avaliação odontológica específica. As alterações mais frequentes são a ausência de dentes, anormalidades no seu formato e o atraso na dentição (Figura 1E). Anormalidades orais como palato ogival e hipoplásico, e fenda labial e palatina também podem ocorrer em pacientes com IP (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014; Swinney, Han e Karth, 2015). Em uma revisão sistemática no período de 1993-2012, anomalias dentais e/ou orais foram observadas em 54% dos casos (Minic *et al.*, 2013a). Devido à alta frequência, os autores sugerem que as anormalidades dentais são, entre as manifestações secundárias da IP, o mais importante critério para o diagnóstico (abordado a seguir) (Minic *et al.*, 2013a). Assim, a realização de

exame odontológico criterioso em todos os pacientes com suspeita de IP é de significativa importância.

#### 1.2.4. Características clínicas: alterações de cabelo, unhas e mamas

Estima-se que em torno de 50% dos pacientes com IP venham a ter anomalias de cabelo (Landy e Donnai, 1993; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Alopecia (Figura 1F) é o defeito mais frequente e geralmente é leve e não-relatada. Outras anormalidades características da IP incluem cabelos esparsos e anomalias de sobrancelhas e cílios (Minic, Trpinac e Obradovic, 2014).

As alterações das unhas em pacientes com IP podem se desenvolver dos 3 até os 45 anos de idade, usualmente ocorrendo após a puberdade (Chun e Rashid, 2010; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Relatos publicados apontam variação da prevalência desse tipo de alteração de 7-48% em pacientes com IP (Landy e Donnai, 1993; Hadj-Rabia et al., 2003; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). As anormalidades variam de sintomas leves a graves, incluindo coiloníquia, quando as unhas apresentam uma forma côncava anormal, e pigmentação amarelada, bem como diferentes graus de distrofia das unhas (Figura 1G) (Poziomczyk et al., 2014).

Outra característica relatada em diferentes estudos são as anormalidades em mamas e mamilos, que incluem mamilos supranumerários, hipoplasia de mamilos e/ou mamas, entre outros (Landy e Donnai, 1993; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Tais achados são citados de forma bastante variável na literatura, desde ausentes (Carney, 1976), até 30% dos casos (Hadj-Rabia et al., 2011; Minic, Trpinac e Obradovic, 2014). Uma possível explicação para essa variabilidade está no fato de que os principais estudos em IP envolvem pacientes neonatos ou crianças pré-adolescentes e é provável que essas características manifestem-se mais tardiamente.

### 1.3. Critérios de Diagnóstico de Incontinência Pigmentar

Os critérios para o diagnóstico de IP foram estabelecidos por Landy e Donnai (1993) e baseiam-se na presença ou não de algum familiar de primeiro-grau com a doença.

No caso de um histórico familiar negativo para IP, é necessária a presença de ao menos um critério maior para o diagnóstico. Os critérios maiores incluem as manifestações cutâneas típicas de IP (eritemas, vesículas, áreas de hiperpigmentação, lesões atróficas ou hipopigmentadas). Os critérios menores incluem defeitos dentais, alopecia e outros defeitos de cabelos, alterações das unhas e defeitos de retina (Landy e Donnai, 1993; Swinney, Han e Karth, 2015). Critérios menores, quando presentes, apóiam o diagnóstico; porém devido à alta frequência desses achados secundários, sua ausência total indica algum nível de incerteza.

No caso de um histórico familiar positivo para IP, apenas um dos seguintes sinais clínicos são necessários para o diagnóstico: presença de lesões de pele típicas, dentição anormal, alopecia ou outras alterações de cabelos, defeitos de retina ou múltiplos abortos de fetos masculinos (Landy e Donnai, 1993; Swinney, Han e Karth, 2015).

Recentemente, Minic, Trpinac e Obradovic (2014) fizeram uma atualização dos critérios propostos em 1993 baseando-se em inúmeros trabalhos que consideraram a necessidade uma atualização. Nos critérios propostos por Landy e Donnai (1993) anomalias orais não-dentais, anomalias oculares não-retinais, anomalias dos mamilos e achados histopatológicos não estavam inclusos. Além disso, naquele momento não se conhecia o papel causal do gene *IKBKG/NEMO* na IP (abordado na próxima sessão) e não existia a possibilidade de confirmação do diagnóstico através de investigação molecular de mutações nesse gene. A classificação atualizada dos critérios de diagnóstico em IP propostos por Minic, Trpinac e Obradovic (2014) é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1. Critérios de Diagnóstico para IP de acordo com Landy e Donnai (1993) e atualizações de Minic, Trpinac e Obradovic (2014).**

<b>Critérios Maiores</b>	<b>Critérios Menores (evidências de apoio)</b>	<b>Condições para o diagnóstico de IP</b>
Estágios cutâneos típicos da IP distribuídos ao longo das linhas de Blaschko:	Anomalias dentais	<b>Nenhuma evidência de IP em familiar feminina de primeiro grau:</b>
	Anomalias oculares	
Estágio vesicular	Anomalias neurológicas	Se não há mutação em <i>IKBKG</i> : necessários dois critérios maiores ou um critério maior e um ou mais critérios menores
Estágio verrucoso	Alopecia	
Estágio hiperpigmentado	Cabelo anormal (escasso, lanoso, anomalias de sobrancelhas e cílios)	Mutação confirmada em <i>IKBKG</i> : qualquer critério maior ou menor
Estágio atrófico/hipopigmentado	Unhas anormais	<b>Evidência de IP em familiar feminina de primeiro grau:</b>
	Anomalias de palato	
	Anomalias de mamas e mamilos	Qualquer critério maior ou ao menos dois menores para o diagnóstico de IP familiar
	Múltiplos abortos masculinos	Em todos os casos, desvio do padrão de inativação do cromossomo X apóia o diagnóstico de IP
	Achados histopatológicos de pele típicos	

Tabela adaptada de Minic, Trpinac e Obradovic (2014).

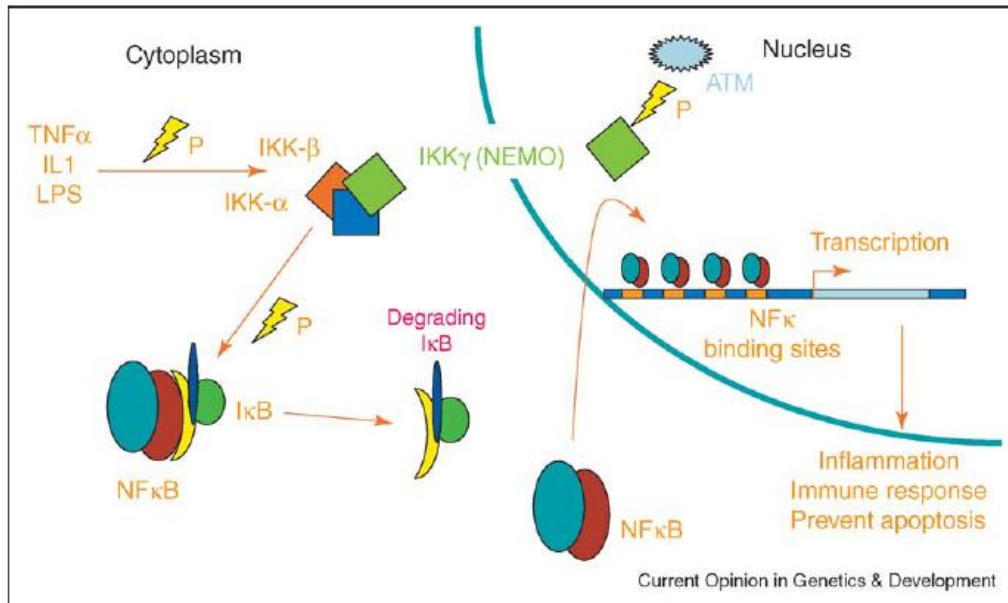
#### **1.4. O gene *IKBKG* e a Incontinência Pigmentar**

A IP é causada por mutações no gene *IKBKG* (*Inhibitor of  $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in  $\beta$  cells, Kinase  $\Gamma$* ; GenBank NM\_003639.3, OMIM #300248), anteriormente conhecido como *NEMO* (*Nuclear factor  $\kappa$   $\beta$  - NF- $\kappa$ B - Essential MOdulator*), localizado em Xq28. A maioria dos pacientes com IP apresentam mutações de perda de função no gene *IKBKG*, embora

mutações hipomórficas, que reduzem mas não eliminam a atividade do gene, também sejam relatadas (Fusco *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2008; Conte *et al.*, 2014). *IKBKG* codifica NEMO/IKK $\gamma$ , de 48 kDa, o componente regulatório do complexo IKK (*inhibitor of the kappa B (I $\kappa$ B) kinase complex*), essencial para modulação do fator nuclear kB, NF-kB (Nelson, 2006). Assim, a IP é a primeira doença hereditária que afeta um dos componentes centrais da via de sinalização de NF-kB (Courtois, Smahi e Israel, 2001).

#### 1.4.1. O papel de *IKBKG* na via de sinalização de NF-kB: consequência das mutações

NEMO/IKK $\gamma$  atua como uma plataforma que liga duas proteínas com atividade quinase (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ), formando o complexo IKK (Nelson, 2006). Esse complexo recebe sinais em resposta a citocinas (como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  – TNF $\alpha$ , e a interleucina 1 - IL1) no citoplasma e sinais de sensibilidade a dano genotóxico através de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) no núcleo, tornando-se ativo. As moléculas inibidoras de kappa B (I $\kappa$ B) sequestram homo e heterodímeros de NF-kB no citoplasma, suprimindo sua atividade. Entretanto, após a ativação do complexo IKK, este atua fosforilando I $\kappa$ B e o marcando para degradação. A partir desse momento, NF-kB pode se translocar para o núcleo onde ativa a expressão de diferentes genes alvo envolvidos nos processos inflamatórios, de resposta imune e de prevenção de apoptose (Israel, 2000; Fusco *et al.*, 2004; Nelson, 2006). Assim, a ausência de NEMO/IKK $\gamma$  torna IKK não-funcional e impede a atividade de NF-kB. A Figura 2 apresenta um esquema do funcionamento da via de NEMO/IKK $\gamma$  e NF-kB.



**Figura 2. Representação esquemática da atuação de NEMO/IKK $\gamma$  na via de NF- $\kappa$ B.** IKK $\gamma$  (quadrado verde) recebe sinais de ativação em resposta a citocinas e/ou dano genotóxico, ativando o complexo IKK (formado juntamente com IKK- $\alpha$  e  $\beta$ , quadrados laranja e azul). O complexo IKK ativo atua fosforilando moléculas inibitórias I $\kappa$ B, que sequestram NF- $\kappa$ B suprimindo sua atividade. A fosforilação de I $\kappa$ B leva à sua degradação, o que permite que NF- $\kappa$ B esteja livre para deslocar-se ao núcleo onde atua ativando uma gama de genes alvo envolvidos em vias essenciais, incluindo a sobrevivência celular. Figura retirada de Nelson (2006).

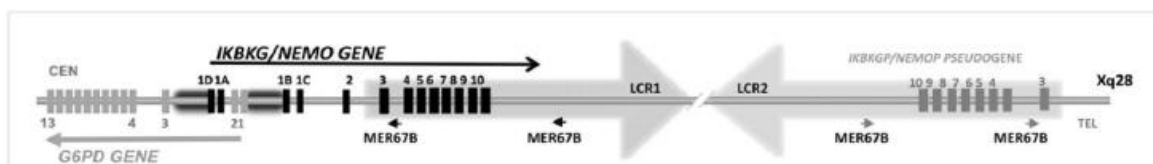
De fato, a ausência de NEMO/IKK $\gamma$  torna as células contendo a mutação em *IKBKG* suscetíveis a apoptose (Courtois, Smahi e Israel, 2001; Nelson, 2006). Na população feminina em geral prevê-se uma razão média de 1:1 em relação a qual dos dois cromossomos X está inativado nas células. Entretanto, mulheres com IP, que carregam mutações em *IKBKG*, apresentam uma forte seleção favorecendo as células com o cromossomo X normal ativo e o mutado inativo (Fusco *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2010; Conte *et al.*, 2014). Esse desvio deve-se ao fato da ausência de NEMO/IKK $\gamma$  tornar as células sensíveis a apoptose (Conte *et al.*, 2014). Ainda, a extensiva apoptose e a ausência de um produto NEMO/IKK $\gamma$  normal leva, no sexo masculino, à letalidade fetal precoce (Courtois, Smahi e Israel, 2001). A heterogeneidade do espectro de manifestações clínicas e a alta variação da gravidade da doença em pacientes com IP deve estar relacionada ao processo de inativação do cromossomo X e ao papel pleiotrópico da via de NF- $\kappa$ B, que está sempre comprometida nessa patologia (Nelson, 2006; Conte *et al.*, 2014).

#### 1.4.2. A organização genômica de *IKBKG*

O gene *IKBKG* apresenta 23 kb e está estruturado em nove éxons codificantes e quatro primeiros éxons alternativos não-codificantes (Fusco *et al.*, 2008). Uma característica notável de *IKBKG* é a sua organização genômica singular, sendo considerado um locus de alta instabilidade em razão da sua arquitetura estrutural (Fusco *et al.*, 2009; Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014).

Na direção a 5', *IKBKG* sobrepõe-se parcialmente ao gene *G6PD* (*Glicose-6-Fosfato Desidrogenase*), cujas mutações levam à deficiência de G6PD ligada ao X, a enzimopatia mais frequente em humanos (Fusco *et al.*, 2012). Na direção a 3', *IKBKG* é parte de uma duplicação de 35,7 kb contendo duas LCRs (*low copy repeats*), LCR1 e LCR2, arranjados em direções opostas. Enquanto LCR1 se sobrepõe ao gene *IKBKG*, LCR2 (a sequência paróloga invertida de LCR1) está sobreposta a uma cópia altamente conservada e não-funcional de *IKBKG*, o pseudogene *IKBKGP* (Fusco *et al.*, 2012). O pseudogene está a 30 kb e em orientação oposta ao gene funcional, abrangendo os seus éxons de 3 a 10. A alta homologia entre LCR1 e LCR2 (>99% de identidade) e sua distribuição em direção oposta favorece a ocorrência de rearranjos que levam ao reposicionamento ou cópia de mutações do pseudogene ao gene (Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014).

Além disso, em ambos LCRs estão presentes múltiplos SINEs (*short interspersed elements*) e LINEs (*long interspersed elements*), micro e macro-homologias, e repetições em tandem, o que leva à instabilidade genômica estrutural no locus de *IKBKG*, predispondo a recombinações aberrantes que contribuem para deleções recorrentes e não-recorrentes (Conte *et al.*, 2014). A Figura 3 apresenta uma representação esquemática do locus da IP.



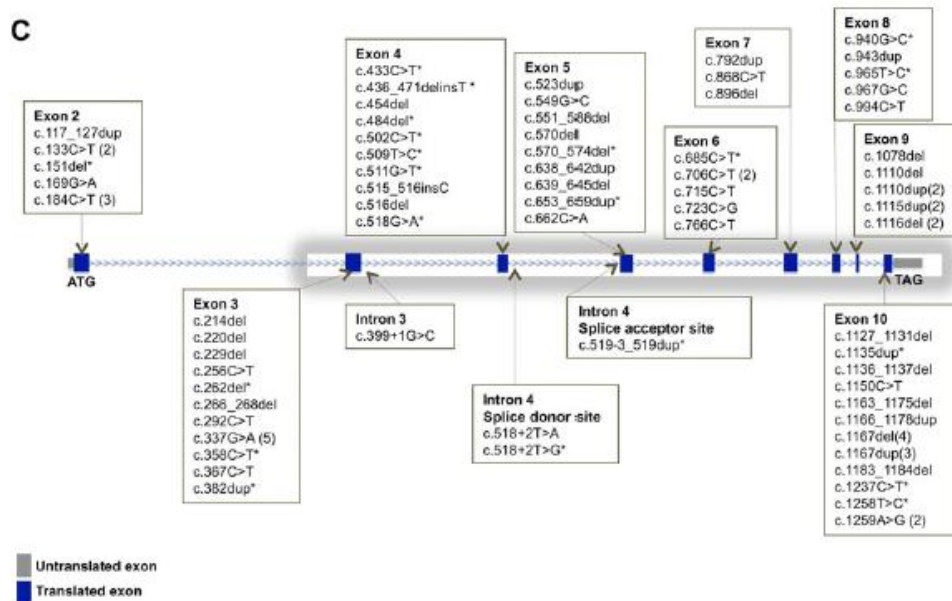
**Figura 3. Representação da estrutura genômica no locus da IP.** Regiões LCR estão representadas em setas largas (LCR1 e LCR2). Éxons de *G6PD*, *IKBKG* e *IKBKGP* estão representados em caixas nas cores cinza claro, preto e cinza escuro, respectivamente. Sequências repetitivas MER67B envolvidas nos principais rearranjos do locus (abordado nas próximas sessões) estão indicadas em setas pequenas. As setas longas e finas indicam a direção transcricional de cada gene. Figura retirada do material suplementar de Conte *et al.* (2014).

### 1.4.3. Mutações em *IKBKG*

A principal alteração em *IKBKG* nos pacientes com IP é uma deleção abrangendo os éxons 4 a 10 do gene e será tratada na próxima sessão. Entretanto, mutações de ponto também são relatadas em casos de IP, existindo 69 diferentes mutações já descritas (Conte *et al.*, 2014). A maior parte delas são do tipo *indel* (54%) e o restante (46%) são substituições de nucleotídeos únicos. Entre as mutações, 52% geram uma quebra do quadro de leitura (*frameshift*), 26% produzem um códon de parada prematuro (*nonsense*), 15% trocam o aminoácido incorporado (*missense*), 6% são mutações em sítios de *splice* e apenas uma única mutação (1%) deleta um aminoácido em fase (Conte *et al.*, 2014).

A maioria das mutações foi relatada apenas uma vez e apenas dez foram relatadas duas ou mais vezes (Conte *et al.*, 2014). Já foram identificadas mutações causadoras de IP em todos os éxons de *IKBKG*, o que é indicativo da importância da sequência de aminoácidos completa para a função gênica (Fusco *et al.*, 2008). Embora não sejam identificados *hotspots* de mutações de ponto na sequência de *IKBKG*, uma região rica em citosinas do éxon 10 é propensa a gerar erros durante a replicação do DNA por mecanismo de deslizamento (*slippage*) (Fusco *et al.*, 2008). A Figura 4 apresenta um esquema das mutações de ponto e pequenas *indel* já descritas na literatura.





**Figura 4. Esquema da região codificante de *IKBKG* com as mutações de ponto e pequenas *indel* já descritas em pacientes com IP.** Os éxons codificantes (de 2-10) estão representados em azul. As caixas de texto indicam as posições de todas as mutações já encontradas em pacientes com IP até o momento. Números entre parênteses indicam o número de vezes em que aquela mutação foi detectada. A parte sombreada da figura aponta a região em que se localiza a região duplicada LCR1. Figura retirada de Conte *et al.*(2014).

Estudos genéticos demonstraram que uma segunda doença associada a mutações em *IKBKG* é a Displasia Ectodérmica Anidrótica com Imunodeficiência (EDA-ID, OMIM #300291). Essa doença ocorre apenas em indivíduos do sexo masculino e está sempre associada a mutações hipomórficas de *IKBKG*, que reduzem, mas não abolem a atividade de NF-κB, uma vez que a ausência do gene leva à letalidade de fetos masculinos durante a embriogênese (Aradhya, Courtois, *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2008; Conte *et al.*, 2014). Interessantemente, os sinais clínicos de meninas com IP e meninos com EDA-ID são marcadamente distintos: enquanto as pacientes com IP não sofrem de imunodeficiência, os meninos com EDA-ID sempre apresentam uma sensibilidade severa a infecções (Aradhya, Courtois, *et al.*, 2001; Courtois e Smahi, 2006; Fusco *et al.*, 2008).

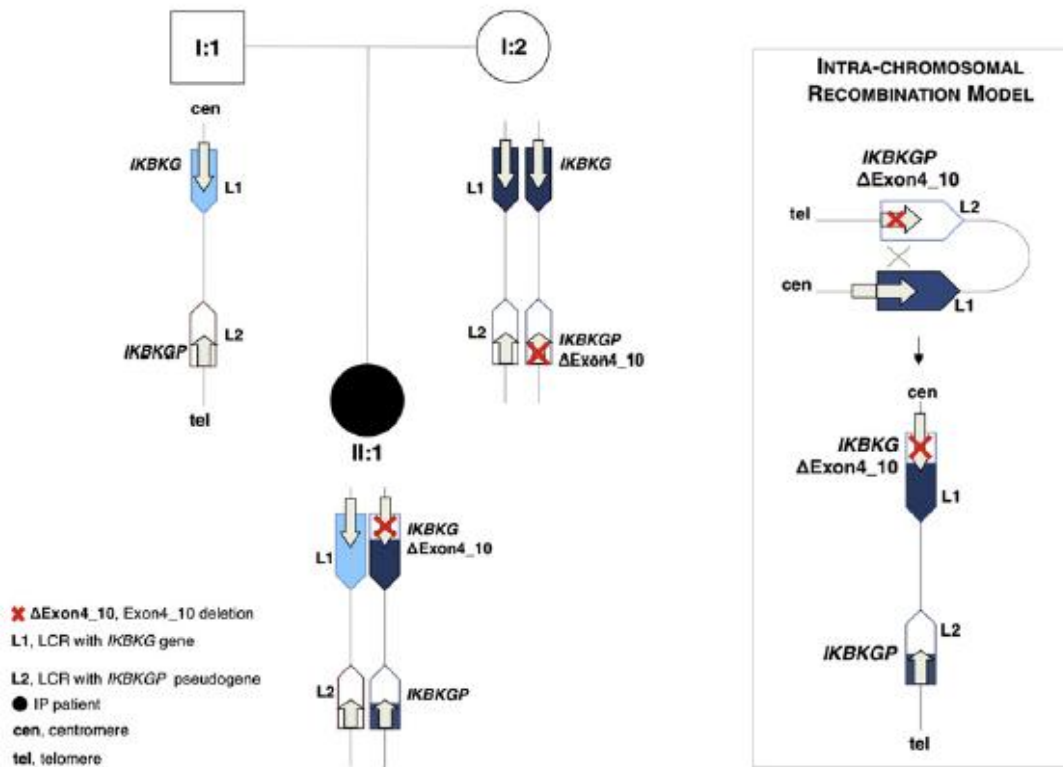
### 1.5. A deleção recorrente dos éxons 4-10 de *IKBKG*

Uma deleção recorrente, que abrange os éxons 4 a 10 do gene *IKBKG* (*IKBKGdel*), é a variante patológica mais comum na IP, estando presente em cerca de 70-80% dos pacientes (Fusco *et al.*, 2013; Fusco *et al.*, 2014). Um

rearranjo entre duas sequências repetidas diretas, chamadas MER67B (*MEdium Reiterated 67B*), leva a recombinação homóloga não-alélica (NAHR; *nonallelic-homologous-recombination*) que remove uma região de ~11.7 kb (Aradhya, Bardaro, *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014). O rearranjo entre as duas repetições causa a excisão da região contendo os éxons 4 a 10, produzindo uma proteína aberrante não-funcional, na qual 26 novos aminoácidos são ligados aos 133 resíduos codificados pelos éxons 2 e 3 (Smahi *et al.*, 2000; Steffann *et al.*, 2004).

O mesmo mecanismo de NAHR é capaz de gerar duas variantes benignas no locus da IP: a deleção dos éxons 4-10 do pseudogene *IKBKGP*, chamada *IKBKGPdel*, e a duplicação dos éxons 4-10 de *IKBKG*, chamada *MER67Bdup* (Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014). Tais variantes não afetam a estrutura de *IKBKG* e, à primeira vista, parecem irrelevantes. Entretanto, elas já foram relatadas em pais saudáveis de pacientes com IP que apresentavam a deleção patológica *IKBKGPdel*, indicando serem alelos de risco para a deleção (Fusco *et al.*, 2009; Fusco *et al.*, 2010; Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014). De fato, a alta incidência de casos esporádicos na IP (65% dos casos) é indício de que um número significativo de recombinações genômicas *de novo* ocorre no locus de *IKBKG* (Aradhya, Bardaro, *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2009).

A Figura 5 apresenta um caso relatado por Fusco *et al.* (2010) em que um evento de NAHR entre as duas sequências LCRs do locus de IP levou à deleção patológica em uma família. A deleção, que estava no pseudogene *IKBKGP* na geração materna, através de um rearranjo intracromossomal se transfere para o gene *IKBKG* durante a meiose, resultando em IP na geração filial.



**Figura 5. Exemplo de rearranjo entre as sequências LCRs do locus de IP levando ao alelo *IKBKG* patogênico.** A mãe (I:2), não afetada, carrega a deleção no pseudogene *IKBKGP*. O rearranjo entre as duas sequências LCRs, L1 e L2, produz uma recombinação intracromossomal que transfere a deleção dos éxons 4-10 do pseudogene para o gene no alelo recombinante. Assim, por esse rearranjo, a filha (II:1) que herdou da mãe o alelo recombinante contendo a deleção patogênica (*IKBKGdel*), apresenta IP. Figura retirada de Fusco et al. (2010).

### 1.5.1. A detecção da deleção recorrente de *IKBKG*

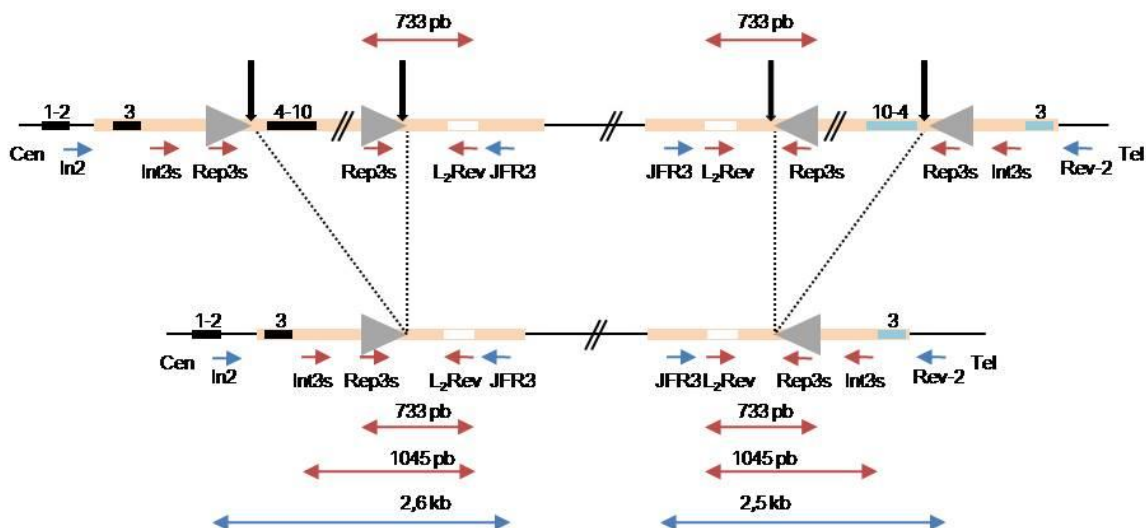
Uma das metodologias mais utilizadas para detecção da deleção recorrente *IKBKGdel* foi descrito por Steffann *et al.* (2004) e baseia-se na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex. Por esse método, utilizam-se três *primers*, sendo dois deles *forward* (Int3s e Rep3s) e um único *reverse* (L<sub>2</sub>Rev). A Figura 6 apresenta um esquema do locus de *IKBKG* indicando as posições dos *primers*. O *primer* Int3s é complementar a uma sequência presente no íntron 3 tanto do gene como do seu pseudogene, enquanto Rep3s é complementar a duas repetições diretas, uma a 311 pb a *downstream* de Int3s e outra a 4033 pb a *downstream* do éxon 10 em ambos, gene e pseudogene. Na presença da deleção, Rep3s pareia a uma única repetição direta remanescente. O *primer reverse* L<sub>2</sub>Rev está localizado em repetições presentes em *IKBKG* e *IKBKGP*.

Por esse método, espera-se que todos os indivíduos testados tenham amplificada a sequência de 733 pb entre os *primers* Rep3s (referente à segunda repetição direta) e L<sub>2</sub>Rev, cobrindo a região a partir do éxon 10 até o final do gene, não incluindo a região de deleção. Pacientes que apresentam a deleção terão amplificada, além da sequência de 733 pb, uma de 1045 pb, cobrindo a região a partir do íntron 3, antes da região deletada, até o final do gene. Em indivíduos sem a deleção *IKBKG*del, a sequência de 1045 pb não é amplificada devido à grande extensão da região entre os *primers* Int3s e L<sub>2</sub>Rev, por cobrir a região entre os éxons 4-10 (~ 11.7 kb). Assim, a banda de 733 pb funciona como um controle interno da reação, enquanto a banda de 1045 pb é indicativa da deleção dos éxons 4-10 de *IKBKG* ou *IKBKGP* (Figura 6).

A grande vantagem dessa metodologia é excluir qualquer artefato da PCR nos casos em que não se consegue detectar o produto específico da deleção, graças à presença do controle interno da amplificação (banda de 733 pb) (Steffann *et al.*, 2004). Entretanto, a limitação da técnica é a não distinção quanto à localização do rearranjo no gene ou no pseudogene. Como mencionado, há relatos de pais saudáveis com o rearranjo em *IKBKGP*, nos quais eventos de recombinação reposicionaram a deleção dos éxons 4-10 do pseudogene para o gene (Fusco *et al.*, 2009).

Dessa forma, uma estratégia combinada vem sendo empregada: após a primeira etapa de PCR Multiplex, uma reação de PCR de longa extensão descrita por Bardaro *et al.* (2003) confirma a presença da deleção e distingue a localização no gene ou no pseudogene.

Nessa segunda reação, o primer *forward* In2 e o *reverse* JFR3 amplificam um produto de 2,6 kb específico da deleção no gene *IKBKG*. In2 é complementar a uma região presente no íntron 2 de *IKBKG*, fora da região duplicada, por isso específica do gene. JFR3 está localizada a *downstream* do éxon 10 do gene, estando, entretanto, presente na região duplicada do gene e pseudogene. Um ensaio de PCR análogo utiliza o mesmo primer JFR3 (nesse caso funcionando como *forward*) e o primer *reverse* Rev-2 para amplificar um produto de 2,5 kb específico da deleção no pseudogene *IKBKGP*. Rev-2 é complementar a uma sequência específica do pseudogene, fora da região de duplicação. Na Figura 6 as posições dos *primers* específicos do



**Figura 6. Locus de *IKBKG/IKBKGP*: primers e fragmentos esperados pelas técnicas de PCR para detecção da deleção recorrente dos éxons 4-10 do gene/pseudogene.** Os éxons de *IKBKG* estão indicados nas caixas em preto, enquanto os éxons de seu pseudogene estão em caixas azuis claro. Setas verticais pretas indicam os pontos de quebras envolvidos no rearranjo recorrente. Pequenas setas horizontais indicam as posições dos primers utilizados no PCR Multiplex (setas em vermelho) descrito por Steffann et al. (2004) e no PCR de longa extensão (setas em azul) descrito por Bardaro et al. (2003). Parte de cima da figura: ausência da deleção recorrente dos éxons 4-10 no gene e pseudogene; único fragmento de 733 pb amplificado no PCR Multiplex. Parte de baixo da figura: presença da deleção recorrente dos éxons 4-10 no gene e pseudogene; no PCR Multiplex são amplificados os fragmentos de 733 e 1045pb, no PCR *IKBKG*-específico um fragmento de 2,6 kb é amplificado e no PCR *IKBKGP*-específico um fragmento de 2,5kb é amplificado.

gene/pseudogene estão indicadas, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados em cada PCR.

A estratégia combinada de PCR Multiplex para detecção da deleção dos éxons 4-10 do gene/pseudogene e a confirmação e a distinção da localização através de um segundo PCR específico para *IKBKG/IKBKGP* tem sido empregada em diferentes estudos com resultados satisfatórios (Song et al., 2010; Lee et al., 2011; Minic et al., 2013b; Okita et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

As genodermatoses, ainda que bem caracterizadas clinicamente, são pouco estudadas quanto a seus aspectos moleculares e patogênicos. Embora os estudos genéticos tenham crescido nos últimos anos, esse número ainda é escasso. Algumas, como a Incontinência Pigmentar (prevalência de 0,7/100.000), apresentam dificuldades adicionais quanto à investigação molecular, pois fazem parte das denominadas “doenças órfãs”, negligenciadas por serem raras. Essa problemática pode ser evidenciada pelo pequeno número de grupos de pesquisa que estudam aspectos genéticos da IP no mundo. No Brasil, um número limitado de estudos genéticos em genodermatoses já foi realizado, mas nenhum relacionado à IP. A falta de conhecimento sobre a doença faz com que muitos casos permaneçam sem o diagnóstico correto.

A IP é uma doença de expressividade bastante variável, com amplo espectro de sinais clínicos. Embora esforços tenham sido investidos na busca por possível correlação genótipo-fenótipo existente, essa questão ainda não está esclarecida. Investigações adicionais, especialmente em casos familiares, podem ajudar ao entendimento das relações genético-clínicas envolvidas. Além disso, são poucas as publicações que tratam de questões intrínsecas aos casos familiares, como a transmissão da mutação e a proporção de afetados em cada geração. Por fim, a investigação de alterações de *IKBKG* em pacientes com IP é de significativa importância para o aconselhamento genético.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar a ocorrência da deleção dos éxons 4 a 10 do gene *IKBK*G, *IKBK*Gdel, em uma série de casos de Incontinência Pigmentar e seus familiares, avaliando características clínicas e achados secundários associados.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Investigar a prevalência da deleção recorrente *IKBK*Gdel em pacientes com IP e seus familiares comparando com dados mundiais;
- Analisar as manifestações clínicas dos pacientes com a deleção, comparando com dados da literatura;
- Avaliar a variabilidade intrafamiliar dos achados clínicos dos pacientes, buscando possível correlação genótipo-fenótipo;
- Investigar as histórias genéticas destas famílias, analisando a proporção sexual e de filhos afetados em cada geração.

#### **4. CAPÍTULO I:**

### **A 23-case series in Incontinentia Pigmenti: the recurrent deletion, the clinical findings and new insights**

Artigo submetido ao periódico Clinical Genetics



## **A 23-case series in Incontinentia Pigmenti: the recurrent deletion, the clinical findings and new insights**

Luiza Monteavaro Mariath<sup>1</sup>, Cláudia Schermann Poziomczyk<sup>2,3</sup>, Fernanda Diffini Santa Maria<sup>3</sup>, Giovanni Marcos Travi<sup>4</sup>, Ana Elisa Kiszewski<sup>2,5</sup>, Lavínia Schuler-Faccini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pathology Post-Graduate Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup>Section of Pediatric Dermatology, Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: Lavínia Schuler-Faccini, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 33089826;

Email: lavinia.faccini@ufrgs.br

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the patients and family members for their participation in this study. We also thank Prof. Nelson Rosa Fagundes for his comments and assistance in transmission ratio analysis. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 573993/2008-4.

## **Abstract**

Incontinentia Pigmenti (IP) is a rare X-linked genodermatosis with several abnormalities in skin, teeth, nails, eyes, hair and central nervous system. IP is caused by mutations in *IKBKG* gene, encoding an essential component to NF- $\kappa$ B pathway activation, fundamental for cell survival. About 70-80% of IP patients present a recurrent deletion of the exons 4 to 10 in *IKBKG* gene (*IKBKGdel*). Our objective was to investigate thoroughly the *IKBKGdel* in a case series of Brazilian IP patients and their relatives, analyzing their clinical manifestations and family histories. The *IKBKGdel* prevalence in our sample was similar to studies worldwide, supporting that this alteration is the most common mutation in IP regardless of ethnic background. Clinical data from patients presenting *IKBKGdel* showed a high intrafamilial variability, indicating no apparent genotype-phenotype correlation, and point out the importance of a specific clinical examination. We found in familial cases a deviation from the expected in Mendelian transmission, with a higher frequency of female and IP affected female than expected, indicating an apparent preferential transmission of the mutated *IKBKG*. Additional studies will be important to support this finding.

**Keywords:** genodermatosis, *IKBKG*, incontinentia pigmenti, *NEMO*

## **Introduction**

Incontinentia Pigmenti (IP; OMIM#308300) is a rare multisystem genodermatosis, affecting mainly skin, but also other ectodermic tissues such as central nervous system (CNS), teeth, eyes, hair and nails (1), with an estimated prevalence at birth of 0.7/100,000 (2). IP is X-linked dominant, usually lethal in males; females can survive due to selective elimination of cells expressing the mutated X chromosome (3, 4).

The skin lesions are a hallmark of IP, being the major criterion for the diagnosis. These cutaneous manifestations usually appear in the neonatal period and naturally evolve in four successive, sometimes overlapping, characteristic stages: an inflammatory first stage, a verrucous second stage, a hyperpigmented third stage and a hypopigmented/atrophic fourth stage (1, 5, 6).

Mutations in the Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Gamma (*IKBKG*) gene (GenBank NM\_003639.3, OMIM #300248), previously called Nuclear factor kappaB Essential Modulator (*NEMO*), are the only known cause for IP (7). *IKBKG* is located at Xq28 chromosome and presents nine coding exons and four alternative non-coding first exons. This gene encodes NEMO/IKKgamma, essential for nuclear factor kappaB (NF-kB) signaling pathway activation, which is fundamental for cell development, survival and function (8, 9). The absence of NEMO/IKKgamma abolishes the NF-kB activity, making cells vulnerable to apoptosis; it explains the male embryos lethality and the skewed X inactivation in females (8).

*IKBKG* gene has a unique genomic organization. It is part of a 37.5 kb segmental duplication containing two low-copy-repeat (LCR) with >99% of identity, one covering the functional gene and the other its partial non-functional pseudogene copy (*IKBKGP*) (10). Moreover, the presence of multiple repeat sequences, micro/macro-homologies and tandem repeats in both LCRs increases the genomic instability of the locus, leading to aberrant recombinations. A recurrent deletion (*IKBKGdel*) of the exons 4 to 10 (~11.7 kb) in *IKBKG* gene is present in 70-80% of IP patients and occurs due to a misalignment between two repeats (called MER67B) (9, 10).

No conclusive findings about genotype-phenotype correlation in IP have been demonstrated yet (7). The investigation of *IKBKG* alterations in IP patients is of significant importance to genetic counseling and prenatal diagnosis purposes and contributes to the genotype-phenotype correlation study (6). No IP genetic study have been published in South America yet, which points out the need of a clinical and genetic investigation of IP patients from these ethnic groups. Our objective here was to investigate in a case series of Brazilian IP patients and their relatives the recurrent deletion (*IKBKGdel*), the clinical manifestations of patients carrying this mutation, the intrafamilial clinical signs variability and the genetic histories from IP families.

## **Material and Methods**

### **Subjects**

Thirty-six individuals from 11 families were subjected to *IKBKGdel* molecular analysis, being 23 female clinically diagnosed IP patients (11 probands and 12 relatives) and

other 13 healthy relatives. All patients met the revised diagnostic criteria for the classification of IP according to Landy and Donnai (1, 7). Patients carrying the recurrent deletion were subsequently selected to clinical and pedigrees analysis. All participants and their relatives received information about the study proposal and signed an informed consent form. This study was approved by the Ethics Committee from Porto Alegre Health Sciences Federal University (UFCSPA), protocol 1412/11.

#### Clinical features

Patients were subjected to an extensive physical examination. Alterations in skin, hair, nails, eyes and teeth, hallmark features of IP, were evaluated by a team including a dermatologist, an ophthalmologist, and a dentist. Dental alterations were classified according to severity in mild (all teeth present, but abnormalities of the forms of crowns present), intermediate (absence of 5 or less teeth, with and without abnormalities of the forms of crowns) or severe (absence of 6 or more teeth, with and without abnormalities of the forms of crowns).

#### Detection of *IKBKGdel*

DNA samples from the 36 individuals included in the study were extracted from peripheral whole-blood samples through Pure Link Genomic DNA (Invitrogen) kit, according to manufacturer's instructions. Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out in all individuals according to Steffann et al. (11). All individuals tested should present a 733-bp sized product as an internal amplification control; whereas the 1045-bp sized product is found in patients presenting the deletion of exons 4-10 of either *IKBKG* or *IKBKGP*. A long-range *IKBKG*-specific PCR was performed according to Bardaro et al. (12) to confirm the deletion of *IKBKG* gene. A 2.6-kb product is expected in patients presenting the pathological *IKBKG* deletion. A similar PCR assay was performed with *IKBKGP*-specific reverse primer to detect the deletion in the pseudogene; in this case, a 2.5-kb product is expected for the *IKBKGP* deletion.

#### Transmission ratio analysis

We tested male (M): female (F) ratio in IP familial cases according to the expected by Mendelian segregation (1M:2F, due to male lethality). Also, we tested whether the

affected:non-affected female offspring ratio followed the expected Mendelian segregation (1:1) using Chi-squared test.

## Results

Among the 36 individuals tested, multiplex PCR and *IKBKG*-specific PCR detected the recurrent exon 4-10 deletion in 19 IP patients (8 index-cases and 11 relatives) from eight families, showing a prevalence of 73% (8/11 families tested). Only clinical data from patients carrying the deletion is included here. Among our eight index-cases three were sporadic (37%) and five were familial (62%). Figure 1 shows the pedigrees of the five familial cases.

All IP patients presented skin manifestations and all IP index-cases of familial cases had cutaneous stages overlapping (Table 1). Vertex alopecia was present in 68% (13/19 patients) and nail defects were in 10% (2/19) of cases. Neurological alterations were observed in just one patient who presented seizures in the first days of life. Three out ten IP patients examined by ophthalmologist showed eyes alteration (Table 1); neither of them had neurological abnormalities. Fourteen patients were subjected to dental examination. Teeth defects were detected in 93% of patients (13/14) and varied of mild (8%), to intermediate (31%) and severe (61%).

Table 1 shows the clinical signs variability within four from the five familial IP cases included in this study. Family V was excluded here since we couldn't obtain reliable clinical information from affected relatives.

Table 2 shows the transmission analysis of *IKBKG* allele. Male:female ratio should be 1:2 following the Mendelian inheritance with male lethality; however, we observed a transmission ratio of 1M:21F ( $p=0.0042$ ). The affected:non-affected ratio in females should be 1:1 following Mendelian segregation; however, we found a transmission ratio of 16:5, or approximately 3 affected: 1 non-affected ( $p=0.0164$ ).

## Discussion

The exon 4-10 deletion prevalence in our sample was 73%, quite similar to that reported in worldwide studies (70-80%) (7, 9, 13). Our findings, therefore, corroborate that this

deletion, irrespectively of the ethnic background, is the most common mutational hotspot in *IKBKG* (14).

After the skin features, teeth defects was the most common characteristic in our IP patients presenting the *IKBKGdel* (93%), followed by vertex alopecia (68%), ocular defects (30%) and nail defects (10%). These prevalences are comparable to that found in a preliminary clinical description from all IP patients included in this study (patients presenting or not the recurrent deletion) (15). Also, our results here are in accordance with those reported in a meta-analysis including worldwide studies (7). Therefore, the clinical manifestations in IP seem not to be related exclusively to the type of *IKBKG* mutation (in this case, *IKBKGdel*).

Most published studies did not perform a specific dental evaluation, and thereby mild cases might go unnoticed, as evidenced in the high variability of dental and oral anomalies reported (31-92%) (7). Minic et al. (2014) (7) suggested that dental and/or oral anomalies represent the most frequent and important minor criteria for IP diagnosis. Our results here support the importance of a systematic specialized dental investigation in all IP patients. In familial cases, dental defects might be an important evidence of IP; as observed in our sample, it is common patients who present only dental signs of IP.

The clinical variability was very high even within families: relatives with the same mutation (*IKBKGdel*) presented a broad range of clinical signs differing in levels of severity (Table 1). For example, in family 1, while a patient presented severe IP, with history of seizures, multiple cutaneous stages overlapping, and alopecia, another case presented only teeth alterations. Previous studies also detected this high variability in IP clinical signs, with reports of a range from mild skin alterations to serious CNS abnormalities in members of a same family (3, 9, 16). Two main hypotheses are believed to collaborate to the intrafamilial variability: differential skewed X-inactivation and *IKBKG* pleiotropic role. IP patients carrying *IKBKG* mutation present a deep selection for cells in which the normal X-chromosome is activated while the mutated is inactivated (8), evidenced by the high X-inactivation skewing of IP cohorts worldwide (3, 9, 14). Patients can show different levels of skewing and different tissues undergo this selection in distinct periods in life, leading to variations in clinical defects. It is believed that the variability in IP phenotypes is explained by a combination of the type

of mutation, the functional domain affected, the X-inactivation skewing patterns and, finally, the genomic background involved (3, 9).

We observed a significant higher prevalence of females than males and of affected than non-affected females (Table 2) in IP pedigrees (Figure 1) than that expected by Mendelian inheritance. These results indicate that the mutated version of *IKBKG* appears to be preferentially transmitted. It is assumed that the segregation ratio distortion results from disruptive mechanisms during gametic or embryonic development phases (17). The main mechanisms include mitotic events occurring in proliferating germ cells, nonrandom segregation of chromosomes during meiosis, differential viability or functionality of gametes, or differential survival during development (18).

The mechanism behind the distortion we found in *IKBKG* segregation is not clear. Since NEMO/IKKgamma is involved in NF-kB activation, essential to inflammation, immunity, cell survival and other fundamental physiological functions, it plays a pleiotropic role, which is difficult to measure (9). Although the intricate behind mechanisms are unknown and uncertain yet, we propose that in a specific moment the decreased expression of NF-kB (due to *IKBKG* mutation) could be advantageous, what would explain the preferential transmission of the mutated *IKBKG* as we observed. Interestingly, *IKBKG* locus is within a genomic instability region (9); hence, a number of other complex mechanisms and factors might be involved. Any hypothesis in this moment can be simplified in view of this complex background. Additional studies are needed in order to gather efforts to unveil this puzzling scenario.

In conclusion, although small, our series of patients with the recurrent *IKBKG* exon 4-10 deletion didn't show a different clinical expression from what expected from the literature indicating that the mixed genetic background in Brazil didn't seem to play a significant role on it. Striking intrafamilial variation suggests that other events like skewed X inactivation could play a major role on the severity of the disease. Interestingly, in our familial cases a strong deviation of the proportions predicted by Mendelian inheritance was observed, both in sex ratio, as well as a higher than expected prevalence of affected female compared to the non-affected ones. If this is only due to chance alone secondary to the small number of participants, or related to an unknown biological mechanism, it's still a matter for further investigations.



## References

1. Landy SJ, Donnai D. Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 1993; 30: 53-59.
2. Orphanet Report Series. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. 2015, from [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alphabetical\\_list.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf) Accessed December, 2015.
3. Fusco F, Bardaro T, Fimiani G et al. Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel *NEMO* mutations interfering with NF-kappaB activation. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1763-1773.
4. Parrish JE, Scheuerle AE, Lewis RA et al. Selection against mutant alleles in blood leukocytes is a consistent feature in Incontinentia Pigmenti type 2. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1777-1783.
5. Poziomczyk CS, Recuero JK, Bringhenti L et al. Incontinentia pigmenti. *An Bras Dermatol* 2014; 89: 26-36.
6. Fusco F, Pescatore A, Steffann J et al. Clinical Utility Gene Card for: incontinentia pigmenti. *Eur J Hum Genet* 2013: 21.
7. Minic S, Trpinac D, Obradovic M. Incontinentia pigmenti diagnostic criteria update. *Clin Genet* 2014; 85: 536-542.
8. Nelson DL. NEMO, NFkappaB signaling and incontinentia pigmenti. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 282-288.
9. Conte MI, Pescatore A, Paciolla M et al. Insight into *IKBKG/NEMO* locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease. *Hum Mutat* 2014; 35: 165-177.
10. Fusco F, Paciolla M, Napolitano F et al. Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours *de novo* pathological alleles through different mechanisms. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1260-1271.
11. Steffann J, Raclin V, Smahi A et al. A novel PCR approach for prenatal detection of the common *NEMO* rearrangement in incontinentia pigmenti. *Prenat Diagn* 2004; 24: 384-388.
12. Bardaro T, Falco G, Sparago A et al. Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti, and a PCR-based method to discriminate *NEMO/IKKgamma* gene deletion. *Hum Mutat* 2003; 21: 8-11.
13. Fusco F, Paciolla M, Conte MI et al. Incontinentia pigmenti: report on data from 2000 to 2013. *Orphanet J Rare Dis*, Vol. 9. England, 2014: 93.
14. Song MJ, Chae JH, Park EA et al. The common NF-kappaB essential modulator (*NEMO*) gene rearrangement in Korean patients with incontinentia pigmenti. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 1513-1517.
15. Poziomczyk CS, Bonamigo RR, Santa Maria FD et al. Clinical study of 20 patients with incontinentia pigmenti. *Int J Dermatol* 2015.
16. Phan TA, Wargon O, Turner AM. Incontinentia pigmenti case series: clinical spectrum of incontinentia pigmenti in 53 female patients and their relatives. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 474-480.
17. Huang LO, Labbe A, Infante-Rivard C. Transmission ratio distortion: review of concept and implications for genetic association studies. *Hum Genet* 2013; 132: 245-263.
18. Bettencourt C, Fialho RN, Santos C et al. Segregation distortion of wild-type alleles at the Machado-Joseph disease locus: a study in normal families from the Azores islands (Portugal). *J Hum Genet* 2008; 53: 333-339.

## Legends

**Figure 1. Pedigrees from IP familial cases and presence of the *IKBKG* exon 4-10 deletion.** All familial cases are caused by *IKBKG* exon 4-10 deletion. Upper gels show multiplex-PCR results; 733 bp bands are reaction control bands and 1045 bp bands indicate the recurrent deletion. Lower gels show *IKBKG*-specific PCR; 2.6 kb bands correspond to specific *IKBKG* deletion. A higher frequency of IP affected children can be observed in all families.

**Table 1. Intrafamilial variability of IP clinical findings**

**Table 2. Transmission of *IKBKG* allele, favoring the *IKBKG*del mutation.**

## Figures/Tables

**Table 1. Intrafamilial variability of IP clinical findings**

<b>Family I</b> (3 members)	History of cutaneous stages	III-1 (2m): all stages except for stage 4 (to date)* III-2 (4y): all stages except for stage 2
	Cutaneous stages overlapping	III-1: stages 1 and 2; stages 2 and 3 III-2: stages 3 and 4
	Teeth defects	II-2: severe teeth alterations III-2: mild teeth alterations
	Hair defects	III-1: alopecia
	Neurological alterations	III-1: seizures episodes
<b>Family II</b> (3 members)	History of cutaneous stages	III-2 (5m): all stages except for stage 4 (to date)* III-1 (4y11m): all stages except for stage 2
	Cutaneous stages overlapping	III-2: stages 1 and 2 III-1: stages 3 and 4
	Teeth defects	II-2: severe teeth alterations III-1: severe teeth alterations
	Hair defects	III-2 and III-1: alopecia
	Nails defects	III-1: nails defects
	Additional information	III-2: deceased due to a metastatic Wilms'Tumor
<b>Family III</b> (5 members)	History of cutaneous stages	IV-1 (4y11m): all stages
	Cutaneous stages overlapping	IV-1: stages 3 and 4
	Ocular defects	III-2: pre-retinal membrane with aspect of fibrosis III-8: retrolental mass in the left eye
	Dental alterations	IV-1: severe teeth alterations III-2: intermediate teeth alterations III-8: severe teeth alterations
	Hair defects	IV-1: alopecia III-8: alopecia II-6: alopecia
<b>Family IV</b> (3 members)	History of cutaneous stages	III-1 (1y11m): all stages except for stage 2
	Cutaneous stages overlapping	III-1: stages 3 and 4
	Ocular defects	II-2: macular alteration in the right eye
	Dental alterations	III-1: intermediate teeth alterations II-2: intermediate teeth alterations II-5: severe teeth alterations
	Hair defects	III-1: alopecia II-5: alopecia

Individuals numbering is relative to pedigrees in Figure 1.

Only patients followed since diagnosis were evaluated to stages overlapping.

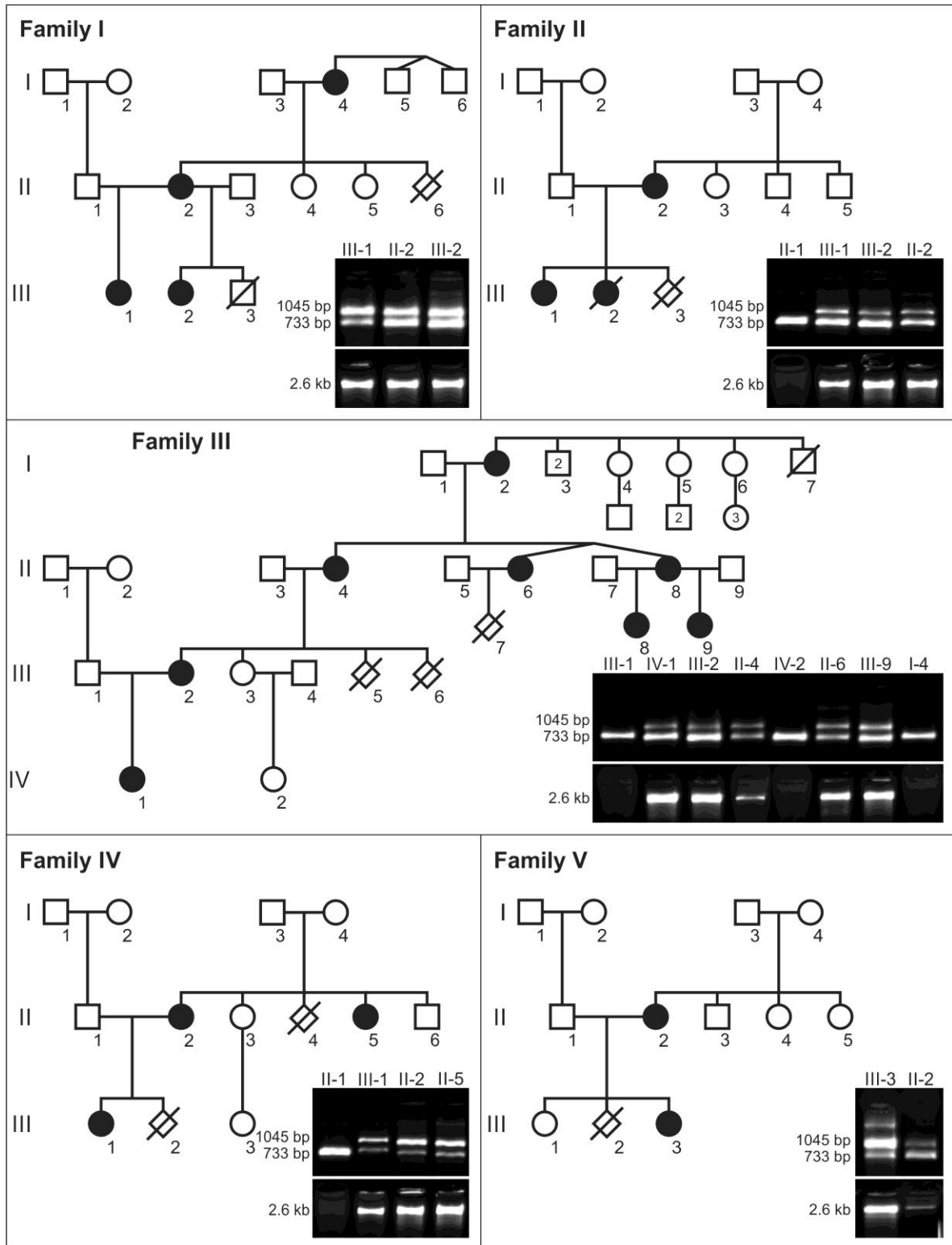
\*Stage 4 may develop later in life, usually during adolescence.

**Table 2. Transmission of *IKBK*G allele, favoring the *IKBK*Gdel mutation.**

	Male		Female		Chi-square analysis
	Observed	Expected	Observed	Expected	
<b>Total offspring*</b>	1 (4.5%)	7.3 (33%)	21 (95.5%)	14.7 (67%)	8.205, P=0.0042
<b>Total female offspring*</b>	Affected female		Unaffected female		Chi-square analysis
	Observed	Expected	Observed	Expected	
	16 (76%)	10.5 (50%)	5 (24%)	10.5 (50%)	5.762, P=0.0164

\*From affected females.

\*Upper lines show male:female ratio analysis; lower lines show affected:non-affected female ratio analysis.



**Figure 1. Pedigrees from IP familial cases and presence of the *IKBKG* exon 4-10 deletion.** All familial cases are caused by *IKBKG* exon 4-10 deletion. Upper gels show multiplex-PCR results; 733 bp bands are reaction control bands and 1045 bp bands indicate the recurrent deletion. Lower gels show *IKBKG*-specific PCR; 2.6 kb bands correspond to specific *IKBKG* deletion. A higher frequency of IP affected children can be observed in all families.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro no Brasil a abordar aspectos genéticos e moleculares da Incontinência Pigmentar. Nós apresentamos aqui a caracterização de uma série de casos de IP, investigando a prevalência da deleção recorrente dos éxons 4-10 de *IKBKG*, trazendo uma análise comparativa dos achados clínicos dos pacientes e explorando novas idéias até o momento não levantadas.

A análise molecular inicial para detecção da deleção *IKBKG*<sub>del</sub> incluiu 36 indivíduos, sendo 23 pacientes com IP (11 casos-índice e 12 familiares) e outros 13 familiares não-afetados. Dezenove indivíduos com IP, provenientes de oito famílias, apresentavam a deleção recorrente (oito casos-índice e 11 familiares). Assim, prevalência da deleção na amostra estudada foi de 73% (8/11 casos-índice), o que está de acordo com a descrita na literatura (70-80%) em diferentes populações já testadas (Phan, Wargon e Turner, 2005; Hsiao *et al.*, 2010; Okita *et al.*, 2013; Fusco *et al.*, 2014). As prevalências correlatas em diferentes estudos apontam que o rearranjo recorrente *IKBKG*<sub>del</sub> é o maior *hotspot* mutacional de *IKBKG*, independentemente do *background* étnico envolvido (Song *et al.*, 2010).

A investigação de familiares saudáveis teve por objetivo averiguar a origem da deleção patológica na família. Diferentes estudos relatam casos em que a deleção dos éxons 4-10 foi transferida do pseudogene para o gene por rearranjo durante a meiose, o que era evidenciado pela presença da deleção não-patológica (no pseudogene) em um dos pais saudáveis e da patológica (no gene) na filha com IP (Fusco *et al.*, 2009; 2010). A instabilidade do locus de *IKBKG* e a presença de inúmeros elementos repetitivos e regiões de homologia leva a uma frequência aumentada de casos desse tipo (Conte *et al.*, 2014). Entretanto, em nenhum paciente com IP foi detectada a deleção no pseudogene. Da mesma forma, nenhum familiar não-afetado apresentou a deleção seja no gene ou no pseudogene.

De um modo geral, as prevalências dos sinais clínicos nos pacientes incluídos na amostra foram comparáveis às descritas em outros estudos, principalmente com relação aos achados cutâneos, oftalmológicos, e de unhas (revisões de achados clínicos da literatura em Minic, Trpinac e Obradovic,

2014; Swinney, Han e Karth, 2015). Alopecia foi uma característica bastante marcante na nossa amostra (68%), o que se deve a precisa avaliação realizada nos pacientes, buscando especialmente aqueles sinais relacionados à IP. Um exame dermatológico específico é essencial para a correta identificação de alterações capilares, especialmente alopecia, que muitas vezes é sutil e passa despercebida (Phan, Wargon e Turner, 2005). Outra manifestação clínica frequente na amostra foram as alterações dentais (93%) presente em todos os pacientes com exceção de apenas um. A ausência de avaliação odontológica específica pode levar à subestimação de casos com tais alterações. Sugere-se que os defeitos dentais sejam o principal critério menor de diagnóstico de IP (Minic *et al.*, 2013a). Na amostra estudada, verificamos casos familiares cuja única alteração presente no momento do exame era dentária, apontando que uma avaliação odontológica específica e precisa é de suma importância para o diagnóstico de IP, especialmente nos casos familiares.

A expressividade dos sinais clínicos dos pacientes com IP foi bastante variável, mesmo quando analisamos dentro de cada família, com a mesma mutação causal. Isso aponta a ausência de correlação entre o tipo de mutação e a manifestação clínica da doença, o que também é observado em outros estudos (Fusco *et al.*, 2004; Phan, Wargon e Turner, 2005; Minic *et al.*, 2013b; Conte *et al.*, 2014). Essa heterogeneidade clínica é especialmente explicada pelo padrão não-aleatório de inativação do cromossomo X em mulheres heterozigotas com IP e pelo papel pleiotrópico de NEMO/IKK $\gamma$ , que atua em diferentes vias de sinalização complexas regulando a expressão de centenas de genes (Nelson, 2006; Conte *et al.*, 2014). Mutações de sentido trocado (*missense*) que afetam levemente a função de NEMO/IKK $\gamma$  parecem levar ao quadro mais leve da doença, mas o pequeno número de casos com esse tipo de mutação impede qualquer comparação estatística (Conte *et al.*, 2014). Assim, provavelmente a variabilidade clínica da IP deve-se a uma combinação de fatores: o tipo de mutação, o domínio funcional afetado, o padrão de inativação do cromossomo X e também o *background* genético de cada indivíduo (Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014).

Na IP há a predominância de casos esporádicos em relação aos familiares em razão da instabilidade genômica do locus de *IKBKG*, que favorece a ocorrência de rearranjos mutacionais (Aradhya, Bardaro, *et al.*,

2001; Fusco *et al.*, 2009). Talvez por isso, a investigação de questões inerentes aos casos familiares, como a frequência de transmissão do alelo mutado de uma geração para a outra e os heredogramas familiares envolvidos, são inexplorados pela grande maioria dos estudos em IP. Neste estudo, analisamos a razão meninos:meninas na progênie de mães afetadas com IP, observando uma prevalência de meninas muito maior, com razão sexual de 1M:21F (M e F: sexo masculino e feminino, respectivamente) ( $p=0,0042$ ). Além disso, o número de meninas afetadas foi maior do que o de não-afetadas, com aproximadamente 3 afetadas:1 não-afetada ( $p=0,0164$ ). Embora nosso número amostral seja pequeno, o desvio do esperado foi bastante evidente, indicando que, aparentemente, a cópia mutada de *IKBKG* é preferencialmente transmitida de uma mãe afetada para sua prole.

Em vista da complexidade genômica do locus de *IKBKG* e o múltiplo papel de NEMO/IKK $\gamma$ , qualquer hipótese *a priori* pode ser simplificada. NEMO/IKK $\gamma$  atua regulando o fator de transcrição NF-kB, essencial para a expressão de vários genes envolvidos em diferentes processos biológicos, incluindo resposta imune, inflamação, crescimento celular e sobrevivência (Nelson, 2006; Zhang e Sun, 2015). Assim, os efeitos das mutações em *IKBKG*, alterando de maneira importante a via de sinalização de NF-kB, não são ainda completamente entendidos. Pode-se sugerir que, em determinado momento, a diminuição da expressão de NF-kB (devido à mutação em *IKBKG*) seria vantajosa para viabilidade gamética, para segregação durante a meiose ou para a sobrevivência durante o desenvolvimento, o que levaria à transmissão preferencial do alelo *IKBKG* mutado. Porém, os mecanismos por detrás desse enigma são, até o momento, não compreendidos e uma série de fatores adicionais e vias complexas devem estar envolvidas.

O escasso número de heredogramas de famílias com IP publicados impossibilitam uma análise mais profunda para averiguar se, de fato, existe um mecanismo biológico levando a essa transmissão preferencial. Ainda, como todos os casos familiares que tínhamos eram causados pela deleção *IKBKG* $\Delta$ , nós não pudemos avaliar se esse desvio de transmissão estaria relacionado à mutação (ou ao tipo de mutação, no caso à mutação de perda de função) ou se seria intrínseco de todos os casos de IP. Portanto, é de extrema importância que pesquisadores de todo o mundo juntem esforços para



esclarecer esses achados, investigando possíveis desvios das proporções preditas pela herança mendeliana em casos familiares de IP. A publicação dos heredogramas de casos já apresentados na literatura também irá colaborar para essa investigação.

Finalmente, a IP é considerada um distúrbio genômico, sendo *IKBKG* um locus de peculiar instabilidade, na qual diversos rearranjos *de novo* acontecem com bastante frequência (Fusco *et al.*, 2012; Conte *et al.*, 2014). Ainda que as principais bases genéticas da IP estejam bem esclarecidas, uma gama de particularidades da doença e do locus de *IKBKG* permanece oculta. A compreensão do mecanismo biológico subjacente à IP é uma meta a ser seguida no futuro.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo é o primeiro no Brasil a investigar dados genéticos e clínicos de pacientes com Incontinência Pigmentar.
- A prevalência da deleção recorrente dos éxons 4-10 de *IKBKG* na nossa amostra indica que esta é a principal mutação na IP, independentemente da origem étnica envolvida.
- Os resultados clínicos que apresentamos mostram a importância de exames direcionados às principais alterações associadas à IP (pele, unhas, dentes e olhos).
- Defeitos dentários são um importante indício para o diagnóstico de IP, sendo considerados o principal critério menor. Isso aponta a importância de avaliação odontológica especializada, particularmente em casos familiares.
- A alta variabilidade intrafamiliar das manifestações clínicas confirma observações prévias de que a *IKBKG*del pode causar um amplo espectro de sinais clínicos, não se observando correlação genótipo-fenótipo direta.
- Observamos um desvio da razão meninos:meninas e meninas afetadas:não-afetadas em relação ao que se espera pela segregação mendeliana, sugerindo que a cópia mutada de *IKBKG* seria preferencialmente transmitida. Estudos adicionais são necessários para esclarecer esse achado.
- Uma diversidade de mecanismos e fatores genéticos complexos permanecem a ser elucidados na IP. O crescente estudo nessa doença trará novas descobertas num futuro próximo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ARADHYA, S., BARDARO, T., GALGOCZY, P., YAMAGATA, T., ESPOSITO, T., PATLAN, H., CICCODICOLA, A., MUNNICH, A., KENWRICK, S., PLATZER, M., D'URSO, M. AND NELSON, D.L. Multiple pathogenic and benign genomic rearrangements occur at a 35 kb duplication involving the *NEMO* and *LAGE2* genes. *Hum Mol Genet* 10, 2557-67, 2001a.
- ARADHYA, S., COURTOIS, G., RAJKOVIC, A., LEWIS, R.A., LEVY, M., ISRAEL, A. AND NELSON, D.L.,. Atypical forms of incontinentia pigmenti in male individuals result from mutations of a cytosine tract in exon 10 of *NEMO* (IKK-gamma). *Am J Hum Genet* 68, 765-71, 2001b.
- BABU, N.A., RAJESH, E., KRUPAA, J. AND GNANANANDAR, G. Genodermatoses. *J Pharm Bioallied Sci* 7, S203-6. , 2015
- BARDARO, T., FALCO, G., SPARAGO, A., MERCADANTE, V., GEAN MOLINS, E., TARANTINO, E., URSINI, M.V. AND D'URSO, M. Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti, and a PCR-based method to discriminate *NEMO*/IKKgamma gene deletion. *Hum Mutat* 21, 8-11, 2003.
- BERLIN, A.L., PALLER, A.S. AND CHAN, L.S. Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J Am Acad Dermatol* 47, 169-87, 2002.
- CARNEY, R.G. Incontinentia pigmenti. A world statistical analysis. *Arch Dermatol* 112, 535-42, 1976.
- CHUN, S.R. AND RASHID, R.M. Delayed onychodystrophy of incontinentia pigmenti: an evidence-based review of epidemiology, diagnosis and management. *J Drugs Dermatol* 9, 350-4, 2010.
- CONTE, M.I., PESCATORE, A., PACIOLLA, M., ESPOSITO, E., MIANO, M.G., LIOI, M.B., MCALEER, M.A., GIARDINO, G., PIGNATA, C., IRVINE, A.D., SCHEUERLE, A.E., ROYER, G., HADJ-RABIA, S., BODEMER, C., BONNEFONT, J.P., MUNNICH, A., SMAHI, A., STEFFANN, J., FUSCO, F. AND URSINI, M.V. Insight into *IKBKG/NEMO* locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease. *Hum Mutat* 35, 165-77, 2014.
- COURTOIS, G. AND SMAHI, A. NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Death Differ* 13, 843-51, 2006.
- COURTOIS, G., SMAHI, A. AND ISRAEL, A. *NEMO*/IKK gamma: linking NF-kappa B to human disease, *Trends Mol Med.* 7, 10, 427-30, 2001.
- DESTEFANO, G.M. AND CHRISTIANO, A.M. The genetics of human skin disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014.
- EHRENREICH, M., TARLOW, M.M., GODLEWSKA-JANUSZ, E. AND SCHWARTZ, R.A. Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome): a systemic disorder. *Cutis* 79, 355-62, 2007.
- FUSCO, F., BARDARO, T., FIMIANI, G., MERCADANTE, V., MIANO, M.G., FALCO, G., ISRAEL, A., COURTOIS, G., D'URSO, M. AND URSINI, M.V. Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel *NEMO* mutations interfering with NF-kappaB activation. *Hum Mol Genet* 13, 1763-73, 2004.

- FUSCO, F., D'URSO, M., MIANO, M.G. AND URSINI, M.V. The LCR at the *IKBKG* locus is prone to recombine. *Am J Hum Genet* 86, 650–653, 2010.
- FUSCO, F., FIMIANI, G., TADINI, G., MICHELE, D. AND URSINI, M.V. Clinical diagnosis of incontinentia pigmenti in a cohort of male patients. *J Am Acad Dermatol* 56, 264-7, 2007.
- FUSCO, F., PACIOLLA, M., CONTE, M.I., PESCATORE, A., ESPOSITO, E., MIRABELLI, P., LIOI, M.B. AND URSINI, M.V. Incontinentia pigmenti: report on data from 2000 to 2013. *Orphanet J Rare Dis* 9:93, 2014
- FUSCO, F., PACIOLLA, M., NAPOLITANO, F., PESCATORE, A., D'ADDARIO, I., BAL, E., LIOI, M.B., SMAHI, A., MIANO, M.G. AND URSINI, M.V. Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours *de novo* pathological alleles through different mechanisms. *Hum Mol Genet* 21, 1260-71, 2012.
- FUSCO, F., PACIOLLA, M., PESCATORE, A., LIOI, M.B., AYUSO, C., FARAVELLI, F., GENTILE, M., ZOLLINO, M., D'URSO, M., MIANO, M.G. AND URSINI, M.V.. Microdeletion/duplication at the Xq28 IP locus causes a *de novo* *IKBKG/NEMO/IKKgamma* exon 4\_10 deletion in families with Incontinentia Pigmenti. *Hum Mutat* 30, 1284-91, 2009.
- FUSCO, F., PESCATORE, A., BAL, E., GHOUL, A., PACIOLLA, M., LIOI, M.B., D'URSO, M., RABIA, S.H., BODEMER, C., BONNEFONT, J.P., MUNNICH, A., MIANO, M.G., SMAHI, A. AND URSINI, M.V. Alterations of the *IKBKG* locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat* 29, 595-604, 2008.
- FUSCO, F., PESCATORE, A., STEFFANN, J., ROYER, G., BONNEFONT, J.P. AND URSINI, M.V. Clinical Utility Gene Card for: incontinentia pigmenti. *Eur J Hum Genet* 21, 2013.
- GREAVES, M. W. Human skin disease (2015) In: Encyclopædia Britannica Online, from <<http://global.britannica.com/science/human-skin-disease>>. Accessed in December 13, 2015.
- HADJ-RABIA, S., FROIDEVAUX, D., BODAK, N., HAMEL-TEILLAC, D., SMAHI, A., TOUIL, Y., FRAITAG, S., DE PROST, Y. AND BODEMER, C. Clinical study of 40 cases of incontinentia pigmenti. *Arch Dermatol* 139, 1163-70, 2003.
- HADJ-RABIA, S., RIMELLA, A., SMAHI, A., FRAITAG, S., HAMEL-TEILLAC, D., BONNEFONT, J.P., DE PROST, Y. AND BODEMER, C. Clinical and histologic features of incontinentia pigmenti in adults with nuclear factor-kappaB essential modulator gene mutations. *J Am Acad Dermatol* 64, 508-15, 2011.
- HOLMSTROM, G. AND THOREN, K. Ocular manifestations of incontinentia pigmenti. *Acta Ophthalmol Scand* 78, 348-53, 2000.
- HSIAO, P.F., LIN, S.P., CHIANG, S.S., WU, Y.H., CHEN, H.C. AND LIN, Y.C. *NEMO* gene mutations in Chinese patients with incontinentia pigmenti. *J Formos Med Assoc* 109, 192-200, 2010.
- IRVINE, A.D. AND MCLEAN, W.H. The molecular genetics of the genodermatoses: progress to date and future directions. *Br J Dermatol* 148, 1-13, 2003.
- ISRAEL, A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10, 129-33, 2000.

- LANDY, S.J. AND DONNAI, D. Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 30, 53-9, 1993.
- LEE, Y., KIM, S., KIM, K. AND CHANG, M. Incontinentia pigmenti in a newborn with *NEMO* mutation. *J Korean Med Sci* 26, 308-11, 2011.
- LEECH, S.N. AND MOSS, C. A current and online genodermatosis database. *Br J Dermatol* 156, 1115-48, 2007.
- MINIC, S., OBRADOVIC, M., KOVACEVIC, I. AND TRPINAC, D. Ocular anomalies in incontinentia pigmenti: literature review and meta-analysis. *Srp Arh Celok Lek* 138, 408-13, 2010.
- MINIC, S., TRPINAC, D., GABRIEL, H., GENCIK, M. AND OBRADOVIC, M. Dental and oral anomalies in incontinentia pigmenti: a systematic review. *Clin Oral Investig* 17, 1-8, 2013a.
- MINIC, S., TRPINAC, D., GABRIEL, H., GENCIK, M. AND OBRADOVIC, M. First *IKBK* gene mutation study in Serbian incontinentia pigmenti patients. *Srp Arh Celok Lek* 141, 490-4, 2013b.
- MINIC, S., TRPINAC, D. AND OBRADOVIC, M. Incontinentia pigmenti diagnostic criteria update. *Clin Genet* 85, 536-42, 2014.
- NELSON, D.L. *NEMO*, NF $\kappa$ B signaling and incontinentia pigmenti. *Curr Opin Genet Dev* 16, 282-8, 2006
- OKITA, M., NAKANISHI, G., FUJIMOTO, N., SHIOMI, M., YAMADA, T., WATAYAKANEDA, M., TAKIJIRI, C., YOKOYAMA, Y., SUNOHARA, A. AND TANAKA, T. *NEMO* gene rearrangement (exon 4-10 deletion) and genotype-phenotype relationship in Japanese patients with incontinentia pigmenti and review of published work in Japanese patients. *J Dermatol* 40, 272-6, 2013.
- ORPHANET REPORT SERIES. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data (2015), from [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alphabetical\\_list.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf). Accessed in December, 2015.
- PHAN, T.A., WARGON, O. AND TURNER, A.M. Incontinentia pigmenti case series: clinical spectrum of incontinentia pigmenti in 53 female patients and their relatives. *Clin Exp Dermatol* 30, 474-80, 2005.
- POZIOMCZYK, C.S., RECUERO, J.K., BRINGHENTI, L., MARIA, F.D., CAMPOS, C.W., TRAVI, G.M., FREITAS, A.M., MAAHS, M.A., ZEN, P.R., FIEGENBAUM, M., ALMEIDA, S.T., BONAMIGO, R.R. AND BAU, A.E. Incontinentia pigmenti. *An Bras Dermatol* 89, 26-36, 2014.
- REYES, M.A. AND EISEN, D.B. Inherited syndromes. *Dermatol Ther* 23, 606-42, 2010.
- SCHEUERLE, A.E. and URSINI, M.V. Incontinentia Pigmenti. *GeneReviews* [Internet], from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1472/>, Seattle (WA), University of Washington, Seattle, 1993-2015.
- SMAHI, A., COURTOIS, G., VABRES, P., YAMAOKA, S., HEUERTZ, S., MUNNICH, A., ISRAEL, A., HEISS, N.S., KLAUCK, S.M., KIOSCHIS, P., WIEMANN, S., POUSTKA, A., ESPOSITO, T., BARDARO, T., GIANFRANCESCO, F., CICCODICOLA, A., D'URSO, M., WOFFENDIN, H., JAKINS, T., DONNAI, D., STEWART, H., KENWRICK, S.J., ARADHYA, S., YAMAGATA, T., LEVY, M., LEWIS,

R.A. AND NELSON, D.L. Genomic rearrangement in *NEMO* impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 405, 466-72, 2000.

SONG, M.J., CHAE, J.H., PARK, E.A. AND KI, C.S. The common NF-kappaB essential modulator (*NEMO*) gene rearrangement in Korean patients with incontinentia pigmenti. *J Korean Med Sci* 25, 1513-7, 2010.

STEFFANN, J., RACLIN, V., SMAHI, A., WOFFENDIN, H., MUNNICH, A., KENWRICK, S.J., GREBILLE, A.G., BENACHI, A., DUMEZ, Y., BONNEFONT, J.P. AND HADJ-RABIA, S. A novel PCR approach for prenatal detection of the common *NEMO* rearrangement in incontinentia pigmenti. *Prenat Diagn* 24, 384-8, 2004

SWINNEY, C.C., HAN, D.P. AND KARTH, P.A. Incontinentia Pigmenti: A Comprehensive Review and Update. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 46, 650-7, 2015

SYBERT, V. Genetic Skin Disorders. Oxford University Press, 2010. 784 p.

ZHANG, H. AND SUN, S.C. NF-kappaB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci* 5, 63, 2015

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Informado

#### Termo de Consentimento Informado

A Incontinência Pigmentar (IP), também é conhecida como Síndrome de Bloch-Sulzberger *ou Incontinentia Pigmenti*. É uma doença de pele de origem genética caracterizada por alterações da própria pele, dentes, sistema nervoso central, olhos e esqueleto.

Estudos moleculares apontam que diferentes tipos de alterações genéticas no cromossomo X (gene *NEMO*) podem levar à incontinência pigmentar. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar os achados clínicos e genéticos (alteração nos cromossomos ou nos exames de DNA) de pacientes e familiares de pacientes com IP, atendidos nos Serviços de Dermatologia e Genética Clínica da UFCSPA.

Após a realização do consentimento informado, você ou seu filho será submetido a uma avaliação médica, com coleta de dados sobre a gestação, parto, história familiar, crescimento e desenvolvimento, resultados de exames e avaliações realizados, além de exame físico detalhado. Também, após a sua permissão por escrito, serão feitas fotos para comparação das características físicas com programas de computador utilizados para estudar as doenças genéticas.

Você também será perguntado a consentir sobre a coleta de uma amostra de 8 ml de sangue, sua ou do seu filho, que será utilizada para a análise cromossômica e extração do DNA, para o estudo de genes associados à IP. As complicações da coleta de sangue são raras e geralmente pequenas, podendo ocorrer alguma dor ou certo desconforto em decorrência da picada da pele. A amostra de sangue, bem como os dados clínicos e as fotos, serão confidenciais e utilizados exclusivamente no estudo da IP. O DNA extraído ficará armazenado na Instituição, sob a responsabilidade dos pesquisadores, com a possibilidade de ser utilizado em estudos futuros relacionados somente a esta doença. Nenhum outro teste ou pesquisa será feito sem a sua permissão por escrito, sendo que também não haverá nenhum custo para a realização destes exames.

Existe a possibilidade de que a participação neste estudo possa fazer você, ou o seu filho se sentirem emocionalmente desconfortáveis. A participação de vocês é inteiramente voluntária. *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de pedir desistência na participação desta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para o seu atendimento ou do seu filho dentro da Instituição onde o projeto está sendo realizado.* Não se dará qualquer informação genética sobre você ou seu filho, a outros membros da família, ou a terceiros sem sua permissão por escrito.

“Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que serei submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo”.

Assinatura do paciente (se maior de 12 anos) \_\_\_\_\_

“Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que meu filho será submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Tive também a oportunidade de discutir e fazer perguntas sobre o trabalho. Eu e meu filho voluntariamente concordamos em participar deste estudo”.

Nome do paciente \_\_\_\_\_

Nome do responsável \_\_\_\_\_

Assinatura responsável \_\_\_\_\_

Parentesco e RG responsável \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA: 3303-8804

Telefone do pesquisador responsável Dra. Cláudia S. Poziomczyk: 3339-5630.

Porto Alegre \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.



## 8.2. Anexo 2: Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

### Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Aspectos clínicos e moleculares de uma amostra de pacientes com fenotipo de Síndrome de Incontinência pigmentar: um estudo prospectivo

Pesquisador Responsável Renan Rangel Bonamigo Parecer nº 1412/11

Data da Versão 13/01/2011

Cadastro 793/11

Data do Parecer 21/07/2011

Grupo e Área Temática Classificação utilizada pela CONEP

#### Objetivos do Projeto

**Geral:** Verificar as características clínicas e moleculares de pacientes com fenotipo de incontinência pigmentar e de suas mães, atendidos pelo serviço de dermatologia da UFSCPA/Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Centro de Saúde Santa Marta e Ambulatório de dermatologia pediátrica do Hospital de CLínicas de Curitiba.

**Específicos:** - Avaliar fatores familiares (história família de IP) e gestacionais, assim como exposição a agentes teratogênicos; - Verificar aspectos associados à evolução clínica dos pacientes com IP, como aquisição de marcos de desenvolvimento, intercorrências e intervenções médicas, internações hospitalares e possíveis fatores prognósticos; - Correlacionar o tipo de mutação encontrada com a gravidade das lesões neurológicas e oftalmológicas.

#### Sumário do Projeto

Serão incluídos todos os pacientes atendidos pelo serviço de dermatologia e genética da UFSCPA, no Centro de Saúde Santa Marta e no Ambulatório de dermatologia pediátrica do Hospital de CLínicas de Curitiba de 2002 até o momento, que apresentarem o fenotipo clínico de IP. serão 18 pacientes e suas mães ( 36 indivíduos) e em Curitiba 15 pacientes e suas mães (30), total 66 indivíduos.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

#### Comentários sobre os itens de Identificação

Serviço de dermatologia e genética da UFSCPA, no Centro de Saúde Santa Marta e no Ambulatório de dermatologia pediátrica do Hospital de CLínicas de Curitiba

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 66 Local 66
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza

<b>Monitoramento da segurança e dados</b>	<b>Não se aplica</b>
<b>Avaliação dos dados</b>	<b>Adequada - quantitativa</b>
<b>Privacidade e confidencialidade</b>	<b>Comentário</b>
<b>Termo de Consentimento</b>	<b>Comentário</b>
<b>Adequação às Normas e Diretrizes</b>	<b>Sim</b>

**Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos**

<b>Cronograma</b>	<b>Adequado</b>
<b>Data de início prevista</b>	
<b>Data de término prevista</b>	
<b>Orçamento</b>	<b>Adequado</b>
<b>Fonte de financiamento externa</b>	<b>Agência de fomento</b>

**Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento**

<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>Adequadas</b>
-----------------------------------	------------------

**Comentários sobre as Referências Bibliográficas**

Recomendação

**Aprovar**

**Comentários Gerais sobre o Projeto**