



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**ANÁLISIS CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y MOLECULAR  
DE UN CASO DE UNA PACIENTE CON  
HIPOMELANOSIS DE ITO Y TRANSLOCACIÓN X;9**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

**GENÉTICA MÉDICA**

P R E S E N T A :

**DR. VICTOR DANIEL BÁRCENAS FIGUEROA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO**

**ASESOR DE TESIS**

**DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO**



**HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO**

**FEDERICO GÓMEZ**

Instituto Nacional de Salud

**65** AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA  
*Salud para las Nuevas Generaciones*

**MÉXICO, D. F.**

**FEBRERO 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso  
Jefe del Departamento de Genética  
Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Tutor de Tesis

---

Dra. Constanza García Delgado  
Médico Adscrito al Departamento de Genética  
Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Asesor de Tesis

---

Dra. Yolanda Rocío Peña Alonso  
Director de Enseñanza y Desarrollo Académico  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres ya que sin el apoyo de ellos yo no estaría aquí.

A mi esposa Gaby y a Emilia por estar a mi lado. Las amo.

A Paulina y Alejandra por su apoyo durante todos estos años.

A Hugo y mis sobrinos.

A la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso por su paciencia y dedicación.

A los médicos adscritos al Departamento de Genética por sus enseñanzas y entusiasmo.

Al M. en C. Roberto Guevara Yáñez y a la Dra. Caridad Aurea Leal por su colaboración para realizar esta tesis.

A mis compañeros R3 por compartir los momentos buenos y malos. Es un privilegio tenerlos de compañeros.

A Idalia, Anita y Judith por apoyarnos y escucharnos siempre.

Al Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez por proporcionar las imágenes histopatológicas.

## **ÍNDICE**

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
I.1 Generalidades	2
I.2 Clasificación de las alteraciones cromosómicas	3
I.3 El cromosoma X y translocaciones	7
I.4 Inactivación del X	9
I.4.1 Metilación del ADN y el cromosoma X	12
I.4.2 Proteínas Específicas de Inactivación del X	13
II. ANTECEDENTES	14
II.1 Hipomelanosis de Ito	14
II.1.1 Manifestaciones Clínicas	15
II.1.1.1 Lesiones Dérmicas	15
II.1.1.2 Anormalidades de Sistema Nervioso Central	16
II.1.1.3 Anormalidades Craneofaciales y otras	16
II.1.2 Patogénesis	17
II.1.3 Diagnóstico	18
II.1.4 Diagnóstico Diferencial	18
II.1.5 Manejo	19
III. TIPO DE ESTUDIO	20
IV. OBJETIVO	20
IV.1 Objetivos Específicos	20
V. JUSTIFICACIÓN	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	21
VI.1 PRESENTACIÓN DEL CASO CLÍNICO	22
VII. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y MOLECULARES	27
VII.1 Análisis por citogenética	27
VII.2 Análisis por FISH	29
VII.3 Estudio molecular para inactivación del X	31
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. ANEXOS	42
X. BIBLIOGRAFÍA	52

## RESUMEN

El complemento cromosómico normal del ser humano es de 46 cromosomas, debe tener una conformación numérica y estructural adecuada para evitar alteraciones en el desarrollo. Entre las alteraciones cromosómicas estructurales se encuentran las translocaciones que involucran al cromosoma X o algún autosoma. Las translocaciones X;autosoma además de alterar la integridad estructural de los cromosomas involucrados pueden ocasionar cambios en el patrón de inactivación del X ya que puede haber inactivación preferencial del cromosoma X normal o en ocasiones del cromosoma X anormal.

En este trabajo se describe el estudio clínico, citogenético y molecular de una paciente femenina de 15 años de edad, quien consultó a la Institución por defecto del pigmento y crisis convulsivas de difícil control. Fue diagnosticada clínica e histopatológicamente con Hipomelanosis de Ito la cual tiene una etiología heterogénea. Existiendo el antecedente de una alteración en mosaico de células de la piel, en algunos casos se acompaña de crisis convulsivas y alteraciones de la migración neuronal, también se ha reportado asociada con alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Por esta razón se realizó estudio cromosómico con bandas GTG en sangre periférica y fibroblastos de regiones hipopigmentadas y de piel normal, el cual demostró un complemento cromosómico 46,X,t(X;9)(Xp11;9q34) en todas las células analizadas. Se realizó análisis por la técnica de FISH con sondas WCP para el cromosoma X y LSI para el gen *ABL* en la región 9q34, que corroboró la implicación de los cromosomas X y 9 translocación referida. El cariotipo en sangre periférica de ambos padres fue normal.

Se realizó análisis de inactivación del X por patrones de metilación en ADN, con la enzima *HpaII* en la paciente y en sus padres, encontrándose que de acuerdo con este estudio ambos cromosomas X en la paciente permanecen activos. Se presenta el análisis de la literatura al respecto.

## I. INTRODUCCIÓN

**I.1 Generalidades.** El genoma de los seres humanos incluye aproximadamente 23,000 genes (*Strachan et al., 2004*). El material genético presenta varios niveles de organización los cuales van desde la doble hélice de ADN hasta el grado máximo de compactación que es el cromosoma, el cual es observable en metafase durante la división celular (Figura 1).

La fórmula cromosómica normal es 46,XX en las mujeres y 46,XY en los varones. El desarrollo normal depende de la integridad numérica y estructural de los cromosomas, de mecanismos de regulación epigenética (*p.e. metilación*) relacionados con expresión génica y a otros factores tales como la inactivación del X en las mujeres (*Belmont et al., 1996*). Este último es un mecanismo evolutivo para compensación de dosis génica entre ambos géneros, se inactiva generalmente al azar uno de los cromosomas X ya sea el de origen paterno o materno, aunque pueden presentarse excepciones relacionadas generalmente con patología en un efecto llamado Lyonización; por esta razón se considera que las mujeres son mosaicos celulares (*Panasiuk et al., 2004; Ng K et al., 2007; Royce-Tolland M y Panning B, 2008*).

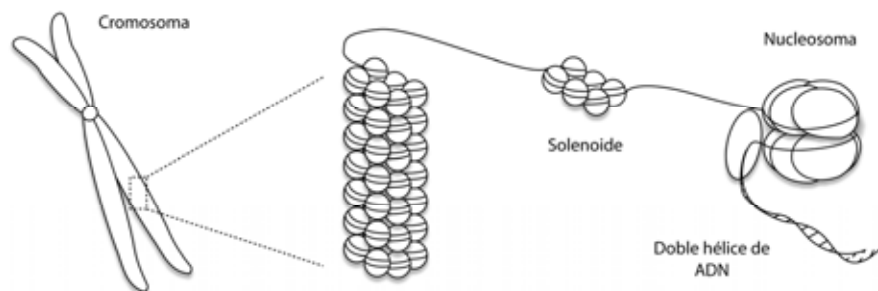


Fig. 1. Niveles de compactación del ADN (Tomado de PAC-Neonatología 3-2007).

## I.2 Clasificación de las alteraciones cromosómicas

En 1888 Waldeyer acuñó el término cromosoma (*que deriva del griego. y significa “cuerpo teñido”*). La técnica de análisis cromosómico ha tenido varias modificaciones desde que fue propuesta, como el uso de solución hipotónica y colchicina para su estudio en metafase *daba una mejor separación de los cromosomas y por lo tanto, un mejor conteo de estos. el otro autor (Hsu et al., 1952)* permitiendo que en 1955 cuando Tjio y Levan establecieran con certeza en cultivos de células embrionarias de pulmón, 46 como el número cromosómico normal (*Tjio et al., 1956, Hsu et al., 1952*).

La técnica de bandas GTG (la habitual desde los 70's) permitió que se describieran mejor las alteraciones cromosómicas, las que pueden ser tanto numéricas como sino también alteraciones estructurales.

La técnica de bandas GTG fue establecida en 1969, se utiliza colorante Giemsa y a través de distintos pasos permite identificar regiones (bandas) de cromosomas más claras o más oscuras. Los cromosomas homólogos comparten el mismo patrón de bandas por lo que se pueden identificar entre sí y diferenciarse del resto. Un análisis citogenético ó cariotipo habitual con bandas GTG da una resolución aproximada de 400 a 600 bandas (*Smeets et al., 2004*).

En 1976, Yunis desarrolló una técnica que permitía visualizar de 500 a 1000 bandas, esto condujo a la identificación de aberraciones tales como microdeleciones en síndromes clínicos ya conocidos (Tabla I y Figuras 2 y

**Técnicas.** La técnica de bandas GTG fue establecida en 1969. Se utiliza colorante Giemsa y a través de distintos pasos permite identificar regiones (bandas) de cromosomas más claras o más oscuras, las cuales se correlacionan con la cantidad de bases nitrogenadas que contengan. Los cromosomas homólogos comparten el mismo patrón de bandas por lo que se pueden identificar entre sí y diferenciarse del resto. Un análisis citogenético ó cariotipo habitual con bandas



GTG nos da una resolución aproximada de 400 a 600 bandas. En 1976, Yunis desarrolló una técnica que permitía visualizar de 500 a 1000 bandas, esto condujo a la identificación de aberraciones tales como microdeleciones en síndromes clínicos ya conocidos. Existen otras técnicas de bandeado como son las bandas R en donde las regiones de bandeado son opuestas a las bandas GTG; las bandas T para regiones teloméricas ó bandas C para centrómeros (Smeets, 2004).

3) (Smeets et al., 2004).

**TABLA I. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES**

<b>Alteración</b>	<b>Definición</b>
Delección	Pérdida de material genético
Duplicación	Misma secuencia de genes aparece en el mismo cromosoma
Inversión	Segmento cromosómico gira 180° sobre sí mismo y se coloca en forma invertida
Translocación	Intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos. Pueden ser balanceadas ó no balanceadas y robertsonianas
Cromosoma en anillo	Pérdida de regiones teloméricas con unión de ambos extremos
Isocromosoma	Posee dos brazos cortos ó dos brazos largos
Cromosoma dicéntrico	Posee dos centrómeros

(Moore et al., 2001 ; Gollin et al., 2005 ; Savage et al., 2005).

El entrecruzamiento de segmentos homólogos no alélicos entre cromátides hermanas ó entre cromosomas homólogos, produce alteraciones cromosómicas del tipo de duplicación directa delección, como se muestra en la figura. 3 (Shaffer et al., 2000).

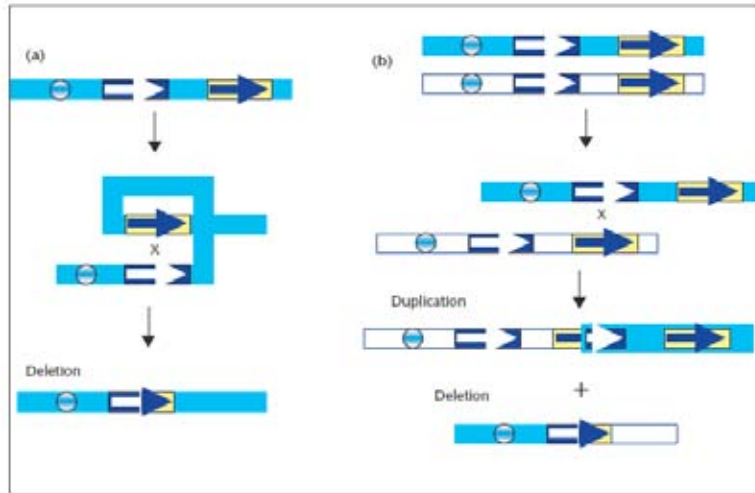
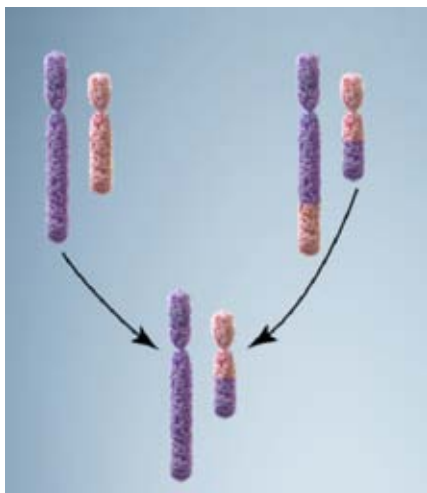
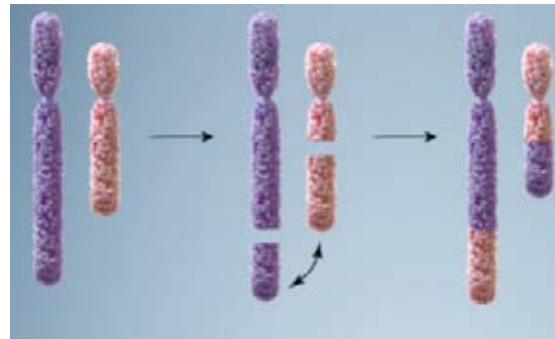


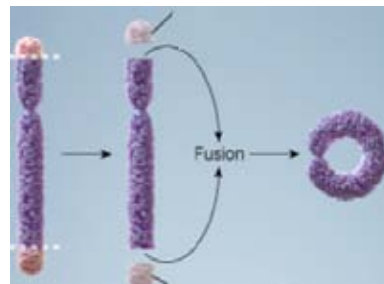
Fig. 3. Modelos para eventos de recombinación homóloga que involucran repetidos de baja copia (LCRs). a) recombinación homóloga intracromosómica entre dos LCRs puede generar una deleción por excisión de un asa intracromátida. b) Los eventos de recombinación homóloga intercromosómica entre dos LCRs de dos cromosomas homólogos puede generar una duplicación y una deleción (Morrow B et al., 2005).



Translocación No Balanceada



ranslocación Balanceada



Cromosoma en Anillo

Fig. 2. Alteraciones estructurales. Modificado de U.S National Library of Medicine, 2008.

Las alteraciones en el material cromosómico cromosómicas tienen consecuencias graves para el fenotipo y el aspecto reproductivo del paciente ya que por ejemplo en el caso de las inversiones que afectan ó no al centrómero pueden producir abortos recurrentes, ó productos malformados o retraso mental (*Thomas et al., 2006*) XXX. Un hecho conocido es que las alteraciones en el material genético pueden causar malformaciones y retraso mental además de muchas otras patologías.

La frecuencia de las alteraciones cromosómicas es detectada en cerca del 0.6% de todos los recién nacidos, el 25% de los abortos y en particular en estos, hasta el 50 al 60% de los abortos ocurridos en el 1er. trimestre del embarazo tienen alteración cromosómica (*Shaffer et al., 2000*). Existen cromosomas llamados marcadores (que no se sabe con certeza a que cromosoma corresponde el fragmento observado). Los rearrreglos estructurales como las inversiones ocurren en 1 de cada 400 pacientes con retraso mental, en 1 de cada 4,000 nacidos vivos y en 1 de cada 1,000 estudios de diagnóstico prenatal. Las alteraciones estructurales están presentes en el 0.1% de los cariotipos prenatales (*Thomas et al., 2006. Marchetti et al., 2005*).

Algunas alteraciones escapan al poder de resolución del microscopio de luz blanca con la técnica de bandas GTG ya que son muy pequeñas para poder ser detectadas. Algunos fenotipos de alteraciones estructurales están bien establecidos como es el Síndrome de Cri du Chat, en el que hay una deleción del brazo corto del cromosoma 5 ó el Síndrome Velocardiofacial que esta asociado a la deleción 22q11.2. La deleción puede ser confirmada por estudios citogenéticos moleculares como es la fluorescencia por hibridación in situ o *FISH* por sus siglas en inglés (*Speicher, et al., 2005. Levsky et al., 2005*). En la técnica de *FISH* una sonda de ADN marcada con una señal fluorescente hibrida una región específica del cromosoma o núcleo en interfase en estudio sin dejar duda de la identificación del fragmento bajo análisis o en su caso se confirma su ausencia si la sonda no hibrida.

Existen otras técnicas moleculares de análisis específico como es el llamado análisis espectral (SKY) ó la hibridación genómica comparativa (CGH) (*Smeets et al., 2004; Levsky et al., 2005. Darai-Ramqvist et al., 2006*).

La determinación precisa de las alteraciones cromosómicas asociadas a un fenotipo particular nos permite acceder a la identificación de regiones y genes específicos cuyos loci esta en la región involucrada. Esta información es valiosa entre otras razones porque proporciona conocimiento nuevo sobre la función normal que pudiera tener esta región y por ende los genes comprendidos en ella. Por otra parte, permite el adecuado asesoramiento genético a los pacientes y familiares de estos para explicar el origen de la patología y el riesgo de recurrencia (*Panasiuke et al., 2004*).

### **I.3 EL CROMOSOMA X Y TRANSLOCACIONES**

Una consecuencia importante de las translocaciones cromosómicas es que dependiendo del sitio de ruptura puede perderse, duplicarse o alterarse la información genética y ocasionar manifestaciones clínicas según los cromosomas involucrados (*Shaffer et al, 2000*). En el caso particular de la paciente que se describe en este trabajo, la translocación es de tipo cromosoma X; autosoma. El cromosoma X tiene características particulares que lo distinguen entre otros aspectos en la expresión de sus genes.

El cromosoma X es actualmente uno de los mejor estudiados debido a su implicación en varias enfermedades y al fenómeno de inactivación. Es un cromosoma submetacéntrico (Figura. 4) el cual contiene 5.6% del genoma total con aproximadamente 160 megabases (Mb) de las cuales de 40 a 50 Mb corresponden al brazo corto y de 110 a 120 Mb al brazo largo. Tiene una densidad de "islas" CpG de 5 a 10 por Mb. El número de genes se estima que es de 2,000 a 3,000 de los cuales se han confirmado 705 (*Franco et al., 2005*).

En los extremos de ambos brazos del cromosoma X existen regiones que se les conoce como pseudoautosómicas (RPA); estas regiones son necesarias para asegurar la recombinación entre el cromosoma X y Y (Franco et al., 2005).

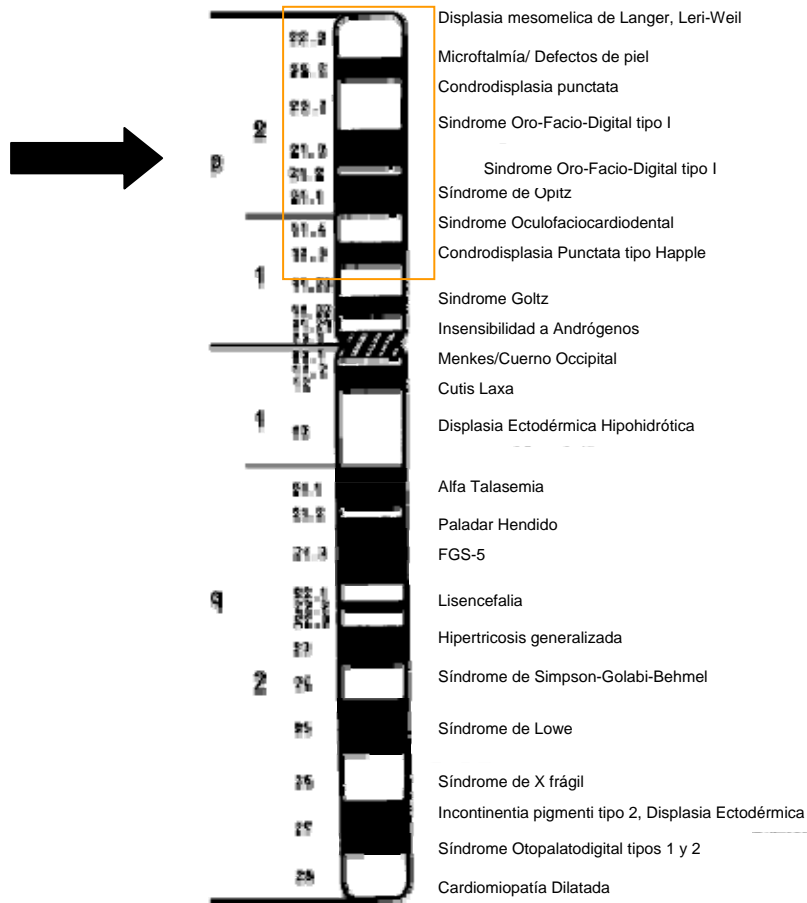


Fig. 4. Ideograma del Cromosoma X en el cual se muestran los loci de algunas enfermedades. Además que se identifica la región involucrada en la translocación de la paciente en estudio (flecha) (Modificado de Carey et al., 2007).

## I.4 INACTIVACIÓN DEL X.

Es un fenómeno que asegura que un solo cromosoma X se mantendrá activo en una célula diploide y el otro será inactivado, funcionando como un mecanismo de compensación de dosis que incrementa la variabilidad de expresión génica en mujeres heterocigotas (*Heard et al., 2004*). La inactivación del X ocurre al final de la primera semana del desarrollo (etapas de mórula y blastocisto), y es al azar en las células fetales, es decir, el cromosoma materno ó paterno pueden inactivarse indistintamente. Una vez que se inactiva el cromosoma X en la célula, toda la descendencia de ésta tendrá el mismo cromosoma X inactivo (inactivación clonal) (*Duthie et al., 2001*).

Sin embargo, se ha observado una inactivación preferencial del cromosoma X de origen paterno en las membranas extraembrionarias durante el desarrollo fetal normal, lo que indica que el cromosoma X con impronta paterna debe mantenerse hasta la formación de los linajes extraembrionarios en el blastocisto (*Gartler et al., 2005*). La mayoría de los genes localizados en el cromosoma X inactivo no son transcritos, excepto algunas regiones que permanecen activas, como las regiones pseudoautosómicas y el gen *XIST* que corresponde al centro de inactivación del X y se localiza en Xq13, su producto es un RNA que no se traduce (Ng K et al, 2007).

La metilación específica de islas CpG localizados en la región del centro de inactivación del X se relacionan con el silenciamiento génico en el desarrollo temprano. Basándose en la expresión de *XIST* en el cromosoma X paterno en el embrión de cuatro células se sugiere que este gen desempeña una función en el inicio y propagación de la inactivación del cromosoma X. Su función en el mantenimiento de la impronta genómica es apoyado por la evidencia de que en tejidos somáticos *XIST* está metilado (y por lo tanto inactivo) en el cromosoma X activo y desmetilado en el cromosoma X inactivo (*Ng et al., 2007*).

Esta situación está relacionada con el concepto de Hipótesis de Lyon establecido en 1961 por la Dra. Mary Lyon en la cual propuso que cada célula de un mamífero mantiene uno y solo un cromosoma X activo inactivando el otro, la manifestación histológica es una estructura condensada llamada cromatina sexual ó cuerpo de Barr (Figura 5) (*Gartler et al., 2005*).

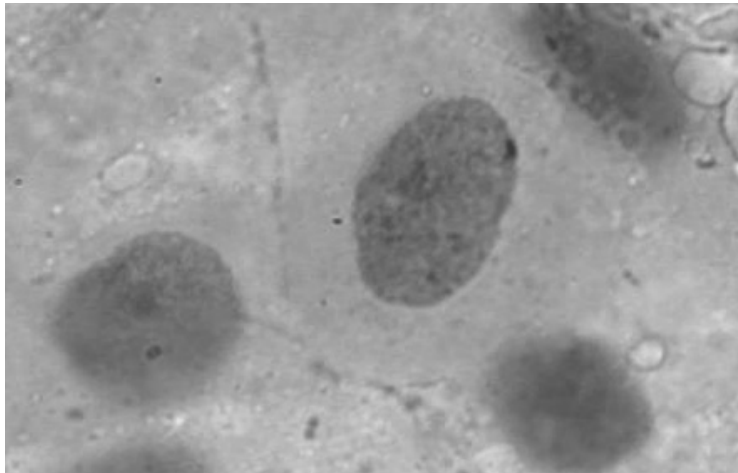


Fig. 5. Micrografía de células epiteliales que muestra el núcleo y dentro de éste el corpúsculo de Barr. Técnica para visualizar cromatina sexual. Laboratorio de citogenética Hospital Infantil de México Federico Gómez.

La inactivación del X en las células somáticas es generalmente al azar teniendo la misma probabilidad de inactivarse tanto el cromosoma materno como el paterno. Si un cromosoma X es inactivado más frecuentemente que el otro, esto puede ocasionar que una mujer portadora de una enfermedad ligada al X recesiva como por ejemplo la hemofilia pueda presentar poca ó ninguna actividad del factor VIII de la coagulación y presente sintomatología clínica (*Heard et al., 2004*).

Como se mencionó, existe grupo de genes que “*escapan a la inactivación*” en las regiones pseudoautosómicas (RPA) en las regiones teloméricas. Esta regiones comparten homología entre el cromosoma X y el Y, los genes en las RPA están presentes en ambos cromosomas así que no hay diferencia de dosis entre hombres y mujeres. La región más pequeña que también escapa a la inactivación, es la RPA localizada en el telómero del brazo largo del cromosoma X (*Duthie S, 2001*).

Existen reportes de genes ligados al X que no tienen su contraparte en el cromosoma Y y sin embargo escapan a la inactivación. Se sugiere que el 10% de los genes en el cromosoma X escapan a la inactivación y solo el 10% de estos genes se encuentran en las RPA (*Gartler et al., 2005*). La mayoría de estos genes que escapan están localizados en el brazo corto del cromosoma X, organizados en dominios funcionales y contienen secuencias de información que especifican la inhibición ó la extensión de una señal de inactivación (Figura 6) (*Duthie et al., 2001*).

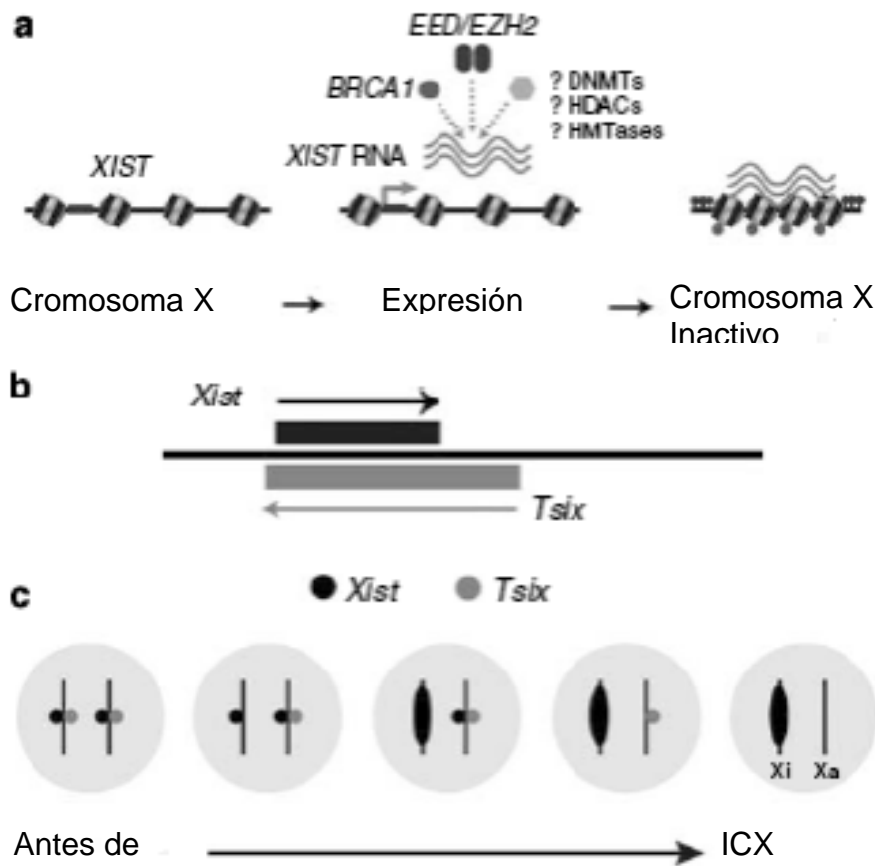


Figura 6. Mecanismos moleculares de la inactivación del X. Fig. 6 a, factores que se ha propuesto interaccionan con *XIST*. Se menciona al antisentido *Tsix* (Fig. 6 b y c) (Modificado de Sun B y Tsao H, 2008).



### **I.4.1 Metilación del ADN y el cromosoma X**

La metilación de la base citosina ocurre por acción enzimática interviniendo las metiltransferasas, ocurre después de la síntesis de ADN y en mamíferos está restringida al dinucleótido 5'-CpG-3' (CpG). Cerca del 7% de estos dinucleótidos se encuentran organizados en grupos o "islas", que están localizadas generalmente en el extremo 5' de los genes. La mayoría de estas islas CpG se encuentran desmetiladas pero aquellas cerca de genes inactivos en el cromosoma X y genes improntados en autosomas, se encuentran metiladas (*Ng et al., 2007*).

Las islas CpG metiladas reprimen la transcripción y la gran mayoría se encuentran en el cromosoma X en células normales. La metilación se encuentra controlada por la expresión de *XIST* y por lo tanto éste controla la iniciación de la inactivación. La metilación quizá no sea el factor responsable de que *XIST* se encienda ó se apague pero quizá tenga una función en mantenerlo estable y reprimido (*Gartler et al., 2005*).

El cromosoma X inactivo comienza y termina su replicación más tardíamente que su homólogo activo. Este tiempo está relacionado con el potencial para la transcripción. Estudios que se han realizado con un agente desmetilante conocido como 5-aza-2'-deoxicitidina, han demostrado que la metilación en regiones controladoras quizá tenga un papel importante y altere el tiempo de replicación sobre dominios de una megabase ó más (*Salstrom et al., 2007*).

El ADN está unido con las histonas para formar la cromatina y si un gen será transcrito esta situación es determinada en parte por las modificaciones que puedan sufrir estas proteínas. La acetilación de las histonas ocurre en residuos de lisina específicos y está catalizada por las acetiltransferasas de histonas (ATH), y las desacetilasas (DACH). En general, la hiperacetilación está asociada con expresión génica y la hipoacetilación con silenciamiento génico. Aparte de la acetilación existen otros modificantes de histonas como la metilación y la

fosforilación. Por ejemplo, la metilación de la lisina 9 en la histona H3 se relaciona con silenciamiento génico, en cambio la metilación de la lisina 4 en la histona H3 se relaciona con expresión génica (*Lakshmi et al., 2007*).

Se han utilizado anticuerpos fluorescentes para marcar residuos de lisina individualmente y han demostrado que el cromosoma X inactivado (a excepción de las regiones que escapan a la inactivación) tiene niveles bajos de las isoformas acetiladas de las histonas H2A, H3 y H4 en humanos, ratones y marsupiales (*Keohane et al., 1999*). Estudios similares también han demostrado que el cromosoma X inactivo se encuentra hipermetilado en la lisina 9 de la histona H3 e hipometilado en la lisina 4 de H3. Esto ha llevado a considerar que después de la activación de *XIST*, las modificaciones en las histonas, principalmente en H3 y H4, se consideran de los cambios más tempranos en el proceso de inactivación (*Heard et al., 2001*).

#### **I.4.2 Proteínas Específicas de Inactivación del X.**

En relación a la familia de histonas llamadas H2A, una de estas es la macro histona 2A1 (mH2A1) que aparentemente no tiene relación con las histonas ya conocidas (*Lakshmi et al., 2007*). Se ha localizado principalmente en el cromosoma X inactivo durante la metafase e interfase de células de varios mamíferos, incluyendo al humano, tanto en hombres como en mujeres por lo que se cree interactúa con *XIST* en el proceso de inactivación.

Otros genes que involucrados en la inactivación del X es por ejemplo la proteína del gen *BRCA1* estaría involucrada en la unión del ARN de *XIST* al cromosoma X inactivo (*Ganesan et al., 2002*).

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Hipomelanosis de Ito

En 1952 Ito describió a una joven japonesa de 22 años que en la parte superior de su cuerpo presentaba lesiones “como si el pigmento hubiera sido borrado”, las lesiones despigmentadas eran dispersas, simétricas y en diferentes formas, con bordes en zig-zag y en gota y no presentaba ninguna otra anomalía (Figura. 7). Ito acuñó el término *incontinentia pigmenti achromians* ya que la pérdida de la pigmentación era similar a los cambios en la incontinencia pigmenti tipo Bloch-Sulzberger. Posteriormente se propuso el término Hipomelanosis de Ito (OMIM \*300337) al ampliarse el fenotipo y así evitar confusión con la incontinencia pigmenti clásica (Taibjee et al, 2004). Se han reportado frecuencias muy variadas en la literatura las cuales van de 1 en 10,000 pacientes anuales en un servicio de neurología pediátrica a 1 en 82,000 individuos en la población general. No hay predominancia de género (Ruggieri et al, 2000).



Fig. 5. Paciente con Hipomelanosis de Ito en el cual se observan manchas despigmentadas en hemitórax izquierdo de diferentes formas (Modificado de Mwaniki et al., 2006).

## II.1.1 Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas más importantes de la HI se consideran a nivel de piel y sistema nervioso central.

### II.1.1.1 Lesiones dérmicas

**Lesiones dérmicas mayores.** Pueden ser de diferentes tipos, incluyéndose descripciones en parches y zig-zag en tórax, en forma de S en abdomen y en forma de V en espalda. Es menos frecuente encontrar estas lesiones en cara y cráneo. En un 50% de los pacientes con HI se detectan estas lesiones al nacimiento, siendo más frecuente que se detecten en los primeros meses de vida o hasta que el niño es expuesto al sol (*Ruggieri et al., 2000*).

Existe evidencia a nivel histopatológico de que en estas lesiones hay una disminución en el número de melanocitos y disminución en el número y tamaño de los melanosomas de la capa basal de la epidermis con disminución en la eumelanina (*Taibjee et al., 2004*).

**Lesiones dérmicas menores.** Se caracterizan por manchas café con leche (*cafe-au-lait*), cutis marmorata, nevo angiomaso, nevo de Ota, manchas mongólicas o ictiosis (*Ruggieri et al., 2000*).

**Anormalidades de pelo, uñas y dientes.** Se han descrito variaciones en el color y la textura del cabello así como alopecia. También hipertriosis facial y ausencia de uñas además de irregularidades en el espacio dental, número y tamaño, implantación dental anormal y defectos en el esmalte dental (*Ruggieri et al., 2000*).

*Anormalidades oftalmológicas.* Se ha encontrado estrabismo, nistagmo, exotropia, miopia, heterocromía y coloboma del iris, dacriostenosis, asimetría corneal, catarata y microftalmía (Taibjee et al., 2004).

### **II.1.1.2 Anormalidades de Sistema Nervioso Central**

**Déficit Intelectual.** Es la alteración del sistema nervioso central más frecuente y varía de leve a severo, encontrándose del 40 al 60% de los pacientes. La asociación de retraso mental y convulsiones es frecuente (60 a 70% de los casos) y se cree que es debido a una migración neuronal anormal (Ruggieri et al., 2000).

**Convulsiones.** Es la segunda alteración neurológica más importante con una frecuencia que va del 11.5% al 50% de los casos. En su mayoría son crisis tónico-clónicas, crisis parciales, crisis mioclónicas y espasmos infantiles. Cabe mencionar que estas convulsiones son de difícil control por lo que en ocasiones se llega a necesitar de más de un anticonvulsivante (Ruggieri et al., 2000). Pueden llegar a presentar comportamiento autista así como trastornos del sueño.

### **II.1.1.3 Anormalidades Craneofaciales y otras**

**Anormalidades craneofaciales.** Se ha descrito macrocefalia, occipucio plano, hipertelorismo y nariz pequeña, son algunas características encontradas en el 20 al 30% de los pacientes.

**Otras.** Con menor frecuencia se pueden encontrar otras alteraciones, por ejemplo xifoescoliosis, cardíacas (tetralogía de Fallot ó defectos septales ventriculares), renales (agenesia, riñón en herradura y acidosis tubular renal). También se ha descrito hipospadias.

### 11.1.2 Patogénesis

La HI se considera causada por diversas etiologías si bien se ha sugerido un tipo de herencia autosómica dominante para este padecimiento, existen reportes en los que se sugiere herencia dominante ligada al X y herencia autosómica recesiva basada en reportes de pacientes afectados con antecedentes de consanguinidad (*Ruggieri et al, 2000*), sin embargo de manera particular se ha reconocido que esta alteración puede deberse a mosaicismo cromosómico el cual se ha descrito en aproximadamente la mitad de los pacientes con esta enfermedad. Se pueden clasificar en dos tipos principalmente:

1. *Mosaicismo para cualquier autosoma o cromosoma sexual*, incluyendo tetrasomía 12q, trisomía 18, diploidía/triploidía 45, X/46, X, r(X) ó 45, X/46, X, + mar y 46, XX/46, XY quimerismo (*Taibjee et al., 2004*).
2. Translocaciones X; autosoma balanceadas con puntos de ruptura en la región yuxtacentromérica del cromosoma X en Xp11 (*Ruggieri et al., 2000*).

La trascendencia del mosaicismo cromosómico está en la relación que este fenómeno puede tener con las alteraciones de la inactivación (preferencial) del X o las disomías funcionales de las regiones involucradas. Como se ha referido, la frecuencia de los casos de HI es de 1:100,000 (*Ruggieri et al., 2000*) mientras que la frecuencia reportada de alteraciones cromosómicas en la población general es de 1:500 individuos (*Shaffer et al., 2000*) y este tipo de alteraciones se han encontrado en sólo 30 a 60% de estos pacientes (*Taibjee et al., 2004*).

### **II.1.3 Diagnóstico.**

Se realiza en base al fenotipo y se apoya por estudios de laboratorio y gabinete. El estudio integral debe incluir las valoraciones por diversos departamentos como son Genética, Neurología, Dermatología y Nefrología. Los estudios de laboratorio y gabinete deben incluir la realización de una tomografía ó resonancia magnética de cráneo en busca de alteraciones anatómicas y un electroencefalograma para valorar actividad epiléptica. La biopsia de piel de las regiones afectadas está indicada en estos casos. Es conveniente hacer un rastreo ultrasonográfico en riñones por la posibilidad de malformaciones asociadas así como un examen general de orina. Es importante en estos pacientes la valoración psicológica ya que es frecuente encontrar déficit cognitivo y alteraciones de la conducta.

Las valoraciones particulares a considerarse en el área de la genética incluyen al cariotipo en sangre periférica y puede considerarse análisis cromosómico en fibroblastos obtenidos de biopsias de las áreas afectadas y no afectadas.

### **II.1.4 Diagnóstico Diferencial**

El diagnóstico diferencial de esta patología incluye a las siguientes entidades y se refiere a otras enfermedades con hipo pigmentación de la piel. La incontinencia pigmenti de Bloch-Sulzberger (OMIM #308300) la cual durante su cuarta etapa cuando las lesiones aparentan ser hipopigmentadas y lineares rodeadas de hiperpigmentación. El nevo hipomelanótico aislado puede llegar a suscitar confusión ya que también se presentan lesiones hipopigmentadas pero estas están desde el nacimiento, son bien definidas y generalmente aisladas (*Ruggieri et al., 2000*).

### **II.1.5 Manejo**

Las lesiones hipopigmentadas no requieren de ningún tratamiento especial pero las anormalidades asociadas (neurológicas, psicológicas, etc.), dependiendo de su localización y severidad deben de ser tratadas. Se recomienda un seguimiento anual después de establecer el diagnóstico y el manejo inicial. Además de las implicaciones de los estudios genéticos y el asesoramiento genético.

En el presente trabajo se estudia a una paciente con diagnóstico clínico de HI en quien se diagnosticó una translocación de tipo X;autosoma  $t(X;9)(p11;q34)$  y se realizó estudio molecular para patrones de inactivación del cromosoma X.



### **III. TIPO DE ESTUDIO**

Descripción de caso clínico

## **IV. OBJETIVO**

Analizar y comunicar el caso de una paciente de 15 años de edad quien presenta diagnóstico clínico de Hipomelanosis de Ito y translocación t(X;9) quien fue evaluada en la consulta de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Describir el fenotipo de la paciente afectado por Hipomelanosis de Ito
- 2- identificar las regiones involucradas de la translocación diagnosticada por la técnica de bandas GTG mediante la realización de análisis cromosómico por la técnica de FISH.
- 3.- Determinar el patrón de inactivación del X.
- 4.- Correlacionar el fenotipo clínico con el genotipo identificado en los estudios moleculares.

## **V. JUSTIFICACIÓN**

Los casos de Hipomelanosis de Ito se consideran mosaicos celulares que se manifiestan clínicamente por cambios de pigmentación. Su etiología es variada ya que se asocia a diferentes alteraciones entre ellas las cromosómicas y mosaicos, si bien esta circunstancia es poco frecuente. El describir el caso clínico actual en que se realiza además del abordaje clínico el estudio molecular para definir alteraciones asociadas por ejemplo del tipo de inactivación del X, nos permitirá obtener un mayor conocimiento científico sobre las bases de esta patología. Además de que permitirá otorgar un asesoramiento genético aún más fundamentado en base a los resultados obtenidos, lo que trascenderá para definir de mejor manera las pautas de atención de este tipo de pacientes y sus familias.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se describe el caso de un paciente femenino quien fue valorado inicialmente por Hipomelanosis de Ito y crisis convulsivas. Posterior a la firma de consentimiento informado se completó su estudio clínico, se realizó estudio por biopsia de piel, estudio cromosómico en sangre periférica por técnica de bandas GTG que demostró una alteración cromosómica t(X;9), la cual fue corroborada por análisis de fibroblastos con bandas GTG y análisis por la técnica de FISH. Debido a que uno de los cromosomas involucrados en la translocación era el cromosoma X se realizaron estudios moleculares de inactivación del X.

## VI.1 PRESENTACIÓN DEL CASO CLÍNICO

La paciente fue evaluada por primera ocasión en el Hospital Infantil de México Federico Gómez a los 6 meses de edad cuando acude con sus padres por presentar alteración generalizada de la pigmentación en piel presente desde el nacimiento. A partir de esta fecha la paciente ha sido continuamente atendida por diferentes Departamentos de HIMFG en su manejo multidisciplinario.

**Antecedentes Heredo-Familiares.** Paciente femenina de 15 años 9 meses de edad quien es producto de la segunda de cuatro gestaciones entre padres jóvenes, aparentemente sanos, no consanguíneos. Tiene una hermana de 10 años con diagnóstico clínico de vitiligo la cual ha sido vista en nuestra Institución y dos hermanas aparentemente sanas (Figura 6 ).

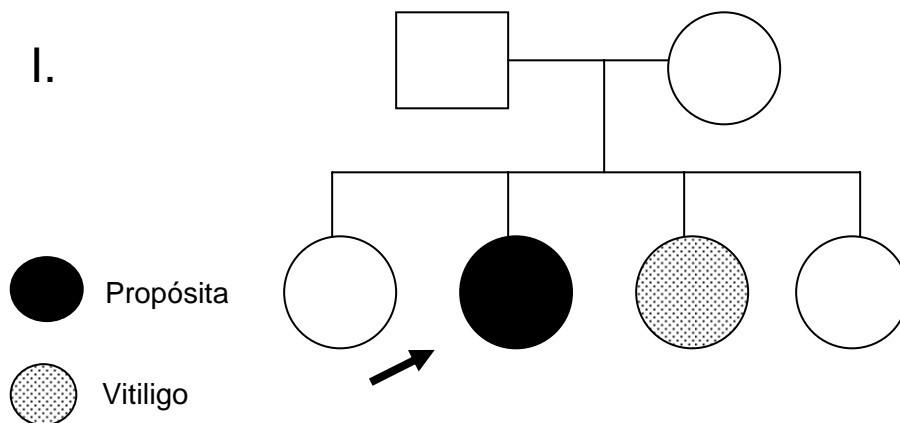


Fig. 6. Árbol genealógico de la propósita.

**Antecedentes perinatales.** Producto de embarazo que cursó con preeclampsia. Fue obtenida a las 37 sdg por cesárea debido a ruptura prematura de membranas y sufrimiento fetal agudo. Tuvo un peso de 2,200 grs, se refiere que tardó en llorar y respirar sin requerir maniobras de reanimación y se desconoce APGAR. Permaneció en UCIN por 20 días por ictericia y peso bajo.

**Antecedentes personales no patológicos.** *Desarrollo psicomotor.* Presentó retraso psicomotor leve en los primeros 3 años de vida. Se realizó estudio de C.I. a los 12 años con resultado de madurez perceptual de 7a 7m. Actualmente educación secundaria. Presentó menarca a los 9 años con ciclos irregulares sin dismenorrea.

**Antecedentes personales patológicos.** Ha presentado crisis convulsivas de difícil control desde los 9 años de edad, evaluada por los Departamentos de Neurología, Psicología, Endocrinología, Consulta de Adolescentes.

**Padecimiento Actual.** Inicia a los 3 meses de edad con la aparición de dermatosis diseminada a tronco y extremidades. A los 9 años presentó crisis de ausencia y cefalea intensa, punzante, de localización frontal sin ceder a analgésicos por lo que acude al HIMFG. Actualmente presenta crisis convulsivas y cefalea en promedio 3 veces por semana la cual se acompaña de visión borrosa.

**Exploración física actual.** Se encuentra paciente femenino de edad aparente menor a la cronológica con peso dentro de percentilas (p50) y talla por debajo de la P>5. Se encuentran lesiones dérmicas las cuales han conservado la misma distribución y características desde el nacimiento: dermatosis diseminada a tronco y extremidades en todas sus caras, caracterizada por manchas hipocrómicas con límites mal definidos, distribución en “remolinos” y siguiendo las líneas de Blaschko (Figura 7) compatible con el diagnóstico clínico de HI. Además presentaba dismorfías menores en cara como implantación alta del pelo en línea anterior, frente amplia, hipertelorismo, puente nasal ancho, narinas evertidas y apiñonamiento de piezas dentarias.

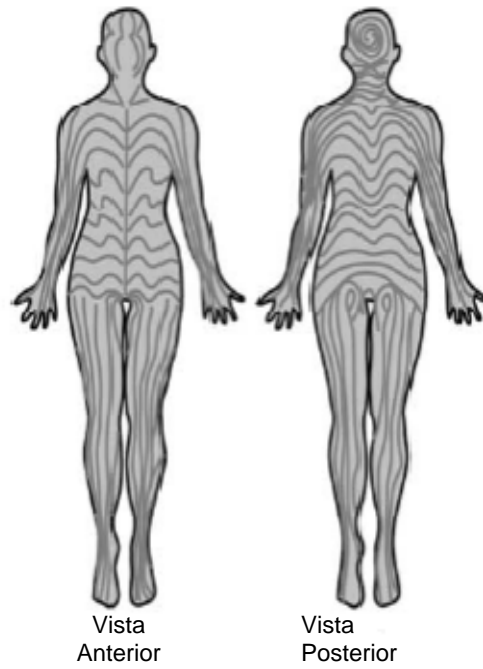


Fig. 6. Líneas de Blaschko comparar con las manifestaciones clínicas de la paciente en le siguiente figura (Figura 7) (Modificado de Sun B y Tsao H, 2008).



Fig. 7a



Fig. 7b.

Figura 7. Características clínicas de la Hipomelanosis de Ito. En la Fig. 9a se observan manchas hipopigmentadas en la espalda siguiendo las líneas de Blaschko. En la Fig. 9b se observan las alteraciones hipopigmentadas en forma de "remolinos" en el costado izquierdo.

## Estudios de laboratorio y gabinete.

Los Departamentos de Dermatología y Patología llevaron al cabo estudio de biopsia de piel con muestra tomada de la cara anterior del muslo derecho. El análisis realizado con la tinción de hematoxilina y eosina demostró hipomelanosis y melanófagos en dermis. El análisis con la tinción de Fontana-Masson, demostró igualmente hipomelanosis con escasos melanocitos (Figuras 8 y 9).

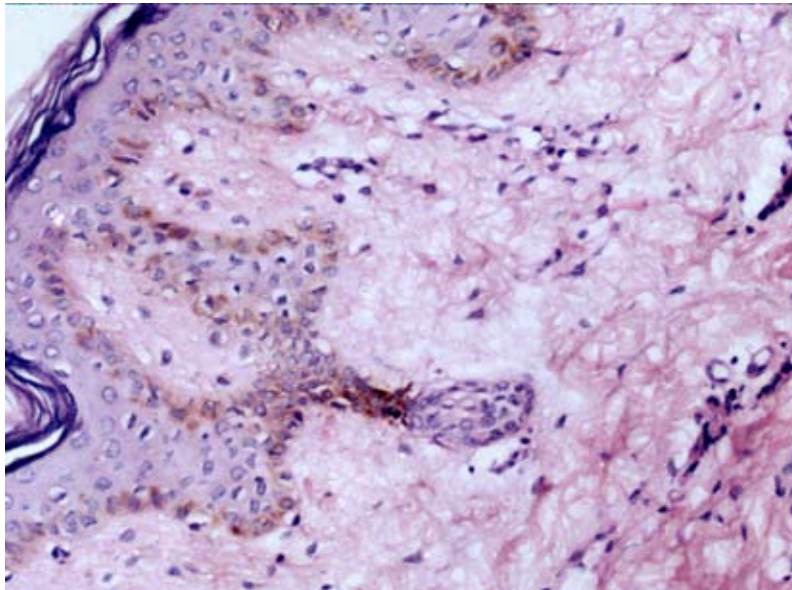


Fig. 8. Biopsia de piel con tinción de hematoxilina y eosina.

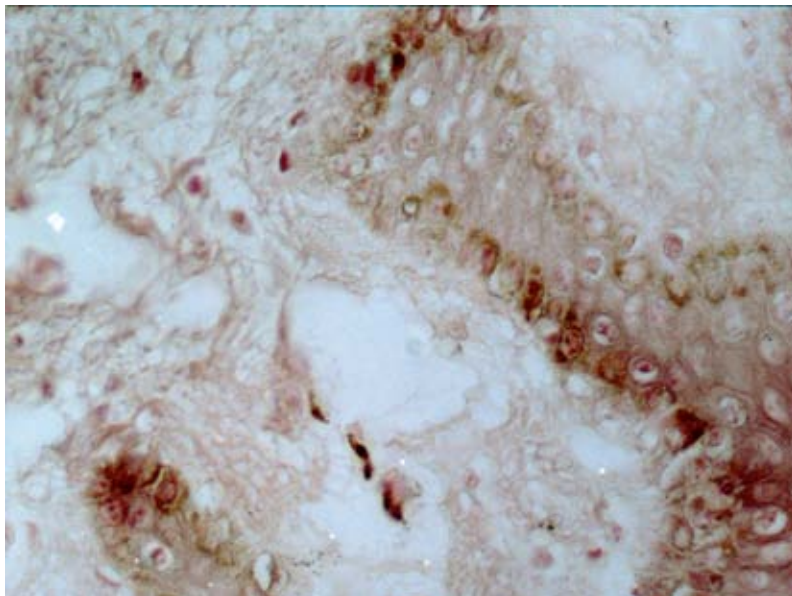


Fig. 9. Biopsia de piel con tinción de Fontana-Mason específica para melanocitos.



El Departamento de Neurología solicitó TAC de cráneo la cual demostró encéfalo dentro de límites normales e inició manejo farmacológico de crisis convulsivas las cuales desaparecieron por algunos meses pero presentó recidiva a pesar de los ajustes de dosis y de medicamentos. Se han realizado electroencefalogramas desde los 9 años de edad, encontrándose actividad epiléptica generalizada con aparente foco en regiones frontales.

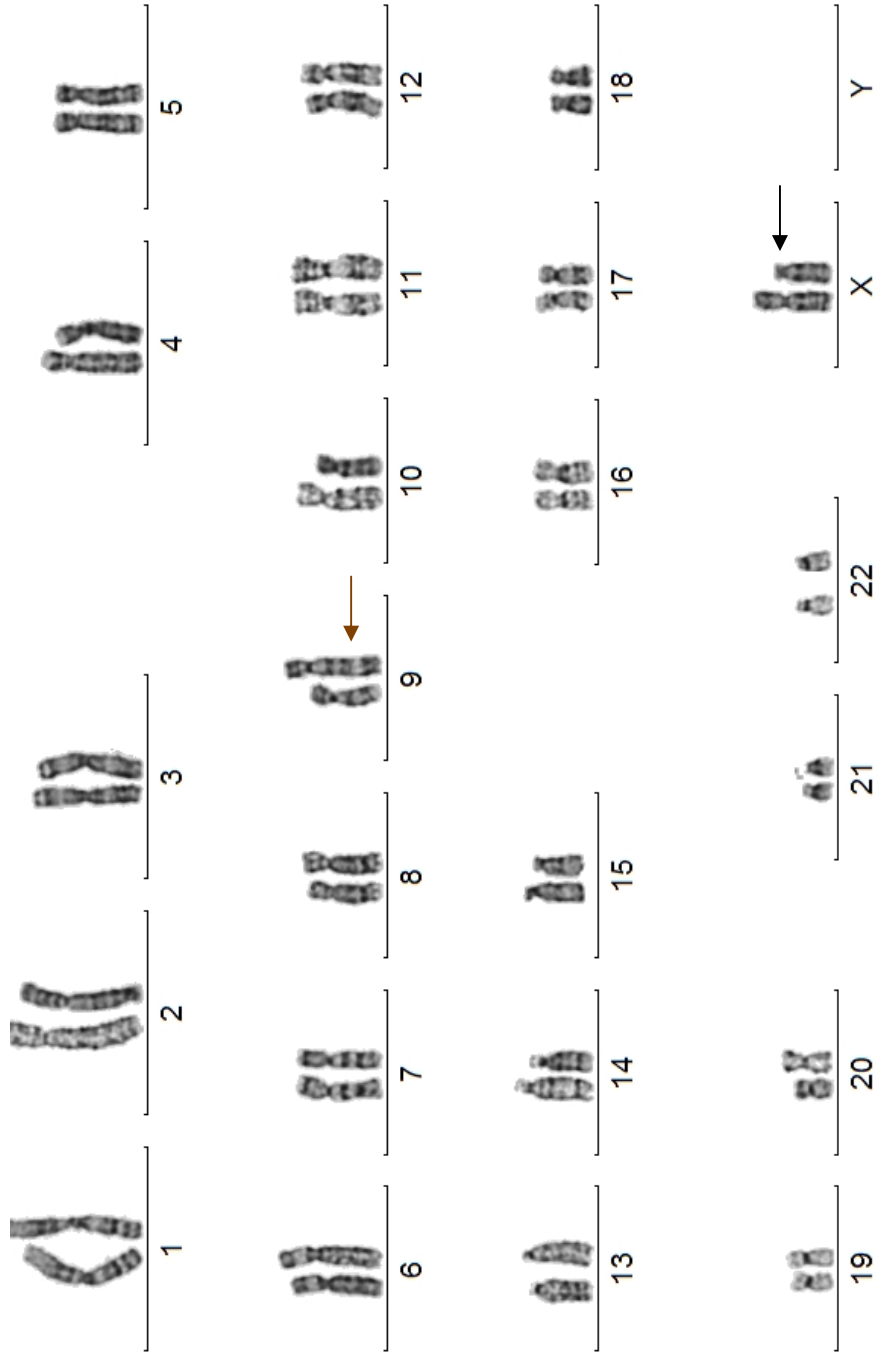
## VII. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y MOLECULARES

### VII.1 Análisis por citogenética.

Como parte de su valoración integral se solicitó cariotipo en linfocitos de sangre periférica con bandas GTG, se revisaron 50 metafases y en todas ellas se demostró el siguiente complemento cromosómico (Figura 10):

46,X, t(X;9) (Xqter→Xp11::9q34→9qter) (9pter→9q34::Xp11→Xpter)

Figura 10. Se muestra el estudio cromosómico con bandas GTG en linfocitos de sangre periférica, las flechas señalan la alteración  $t(X;9)$ .



Por la presencia de la translocación, se realizó cariotipo por técnica de bandas GTG en linfocitos de sangre periférica en ambos padres los cuales fueron reportados como normales. Se realizó estudio cromosómico en fibroblastos de la paciente, las biopsias se obtuvieron tanto de la piel con pigmentación normal como de la zona hipomelanótica, en ambas se confirmó la presencia de la translocación en 50 metafases analizadas. El estudio cromosómico de la hermana de la propósita realizado por técnica de bandas GTG en linfocitos de sangre periférica fue normal y en la valoración de las lesiones dérmica hipomelanóticas que presentaba fue confirmado el diagnóstico de vitiligo.

## **VII.2 ANÁLISIS POR FISH**

Con el objetivo de confirmar que los cromosomas X y 9 se encontraban involucrados en la translocación, se realizó estudio de FISH con las sondas LSI® BCR/ABL DC, SF Translocation Probe Set para la región q34 del cromosoma 9 y WCP Spectrum Green Probe para el cromosoma X. El responsable del estudio por FISH y de fibroblastos fue el M.C. Roberto Guevara Yáñez. El resultado del estudio se muestra en las Figuras 11 y 12, en donde se confirman las regiones involucradas de los cromosomas X y 9 (Ver Anexos).

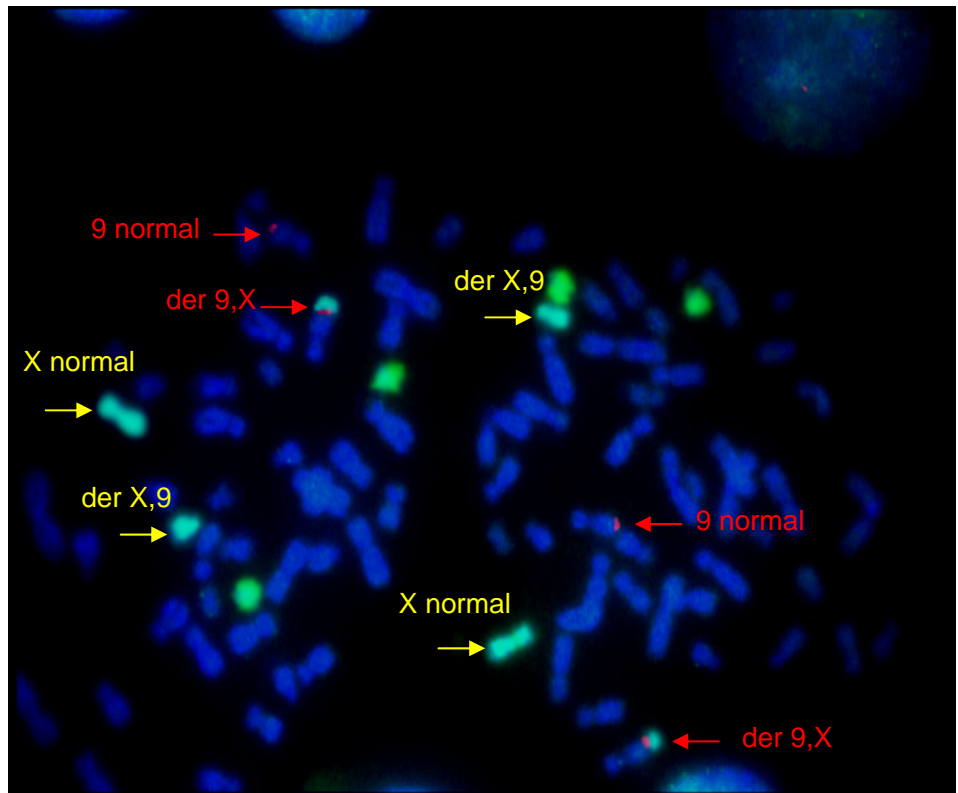
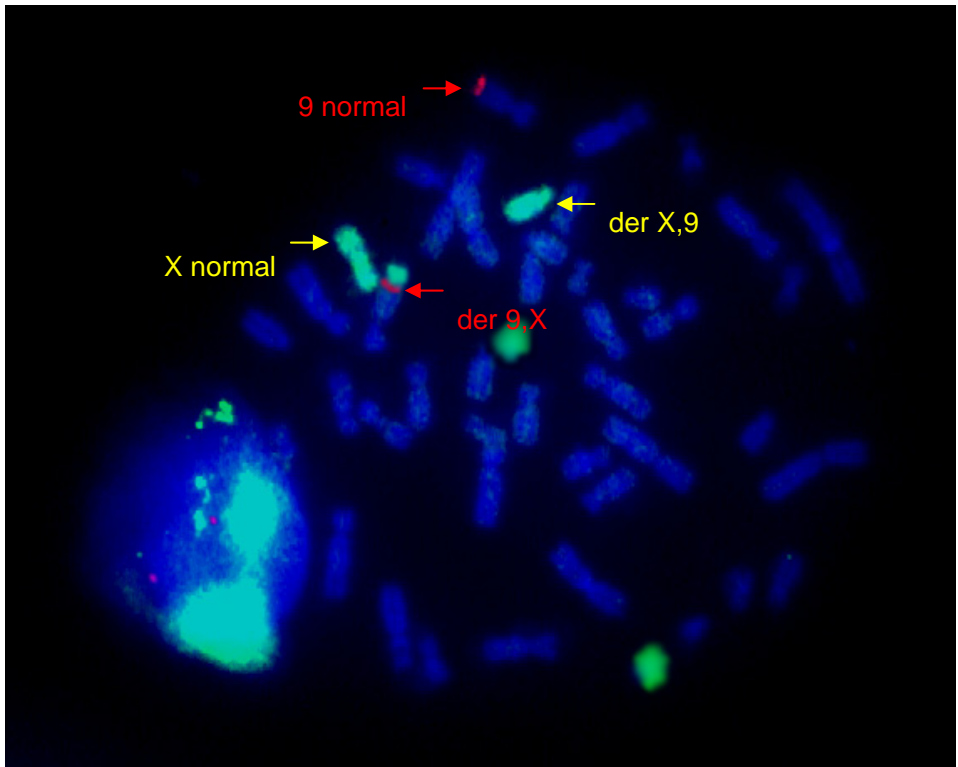


Fig. 11 y 12. FISH en metafase. Señal verde (WCP) cromosoma X, señal roja (LSI) para ABL en 9q34 y señal verde para BCR en 22q11.2. Se identifica la translocación (X;9) al observar dos señales una verde (X) y otra roja (9q34) en el derivativo 9.

### VII.3 Estudio molecular para inactivación del X

Se realizó análisis de inactivación del cromosoma X por la técnica de PCR en ADN de sangre periférica. Este método descrito por Allen *et al* se basa en que la metilación de los sitios *HpaII* y *HhaI* ubicados en el primer exón del locus del receptor de andrógenos humano (*HUMARA*) se correlaciona con la inactivación del cromosoma X. La proximidad de estos sitios de restricción enzimática a un repetido en tandem corto (RTC) altamente polimórfico permite el uso del ensayo por PCR para identificar los patrones de metilación tanto del cromosoma X materno como del paterno (Allen *et al*, 1992).

Cuando el ADN es inicialmente digerido ya sea por *HpaII* ó *HhaI*, la amplificación sólo ocurrirá si los sitios de restricción están metilados; si cualquier otro de los sitios no está metilado, la digestión ocurrirá entre los oligonucleótidos flanco y la amplificación no será posible. Si la metilación de estos sitios se correlaciona con la inactivación del cromosoma X, entonces se obtendrá producto sólo cuando el cromosoma X esté inactivo.

La proximidad de este repetido (CAG) con los sitios sensibles a metilación permite distinguir en una mujer el cromosoma X materno y el cromosoma X paterno. Se ha visto también que en una mujer, en la cual no se lleva a cabo una inactivación al azar, el alelo más comúnmente inactivo será el que se amplifique y esto será detectado por una banda de mayor densidad (Figura 13) (Allen *et al.*, 1992).

Los resultados del análisis se muestran en la Figura 14, la responsable del estudio fue la Dra. Caridad Aurea Leal.

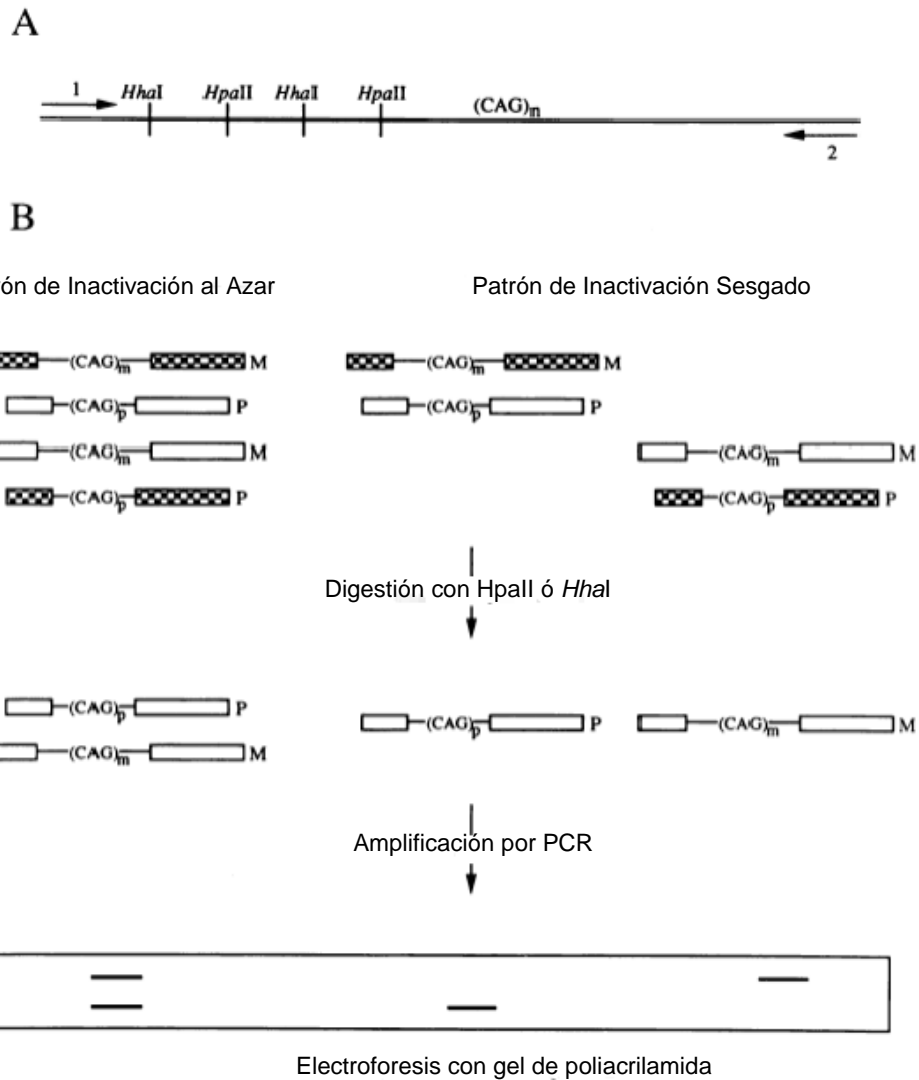


Fig. 13. A. Diagrama de la región amplificada en el primer exón del receptor de andrógenos humanos. Existen dos sitios *Hha* y dos *HpaII* que se encuentran a la distancia de 100 pb 5' del repetido polimórfico CAG. Los oligonucleótidos están especialmente diseñados para flanquear estos sitios sensibles a metilación. B. Diagrama de flujo que ilustra los resultados esperados de DNA aislado de células poblacionales que muestra ya sea un patrón al azar de inactivación ó un patrón sesgado. M y P = Cromosoma X materno ó paterno, respectivamente. (CAG)<sub>m</sub> y (CAG)<sub>p</sub> = Alelo asociado con el repetido polimórfico ya sea en el cromosoma X paterno ó materno. La amplificación por PCR sólo dará producto del cromosoma X inactivo (*Modificado de Allen et al., 1992*).

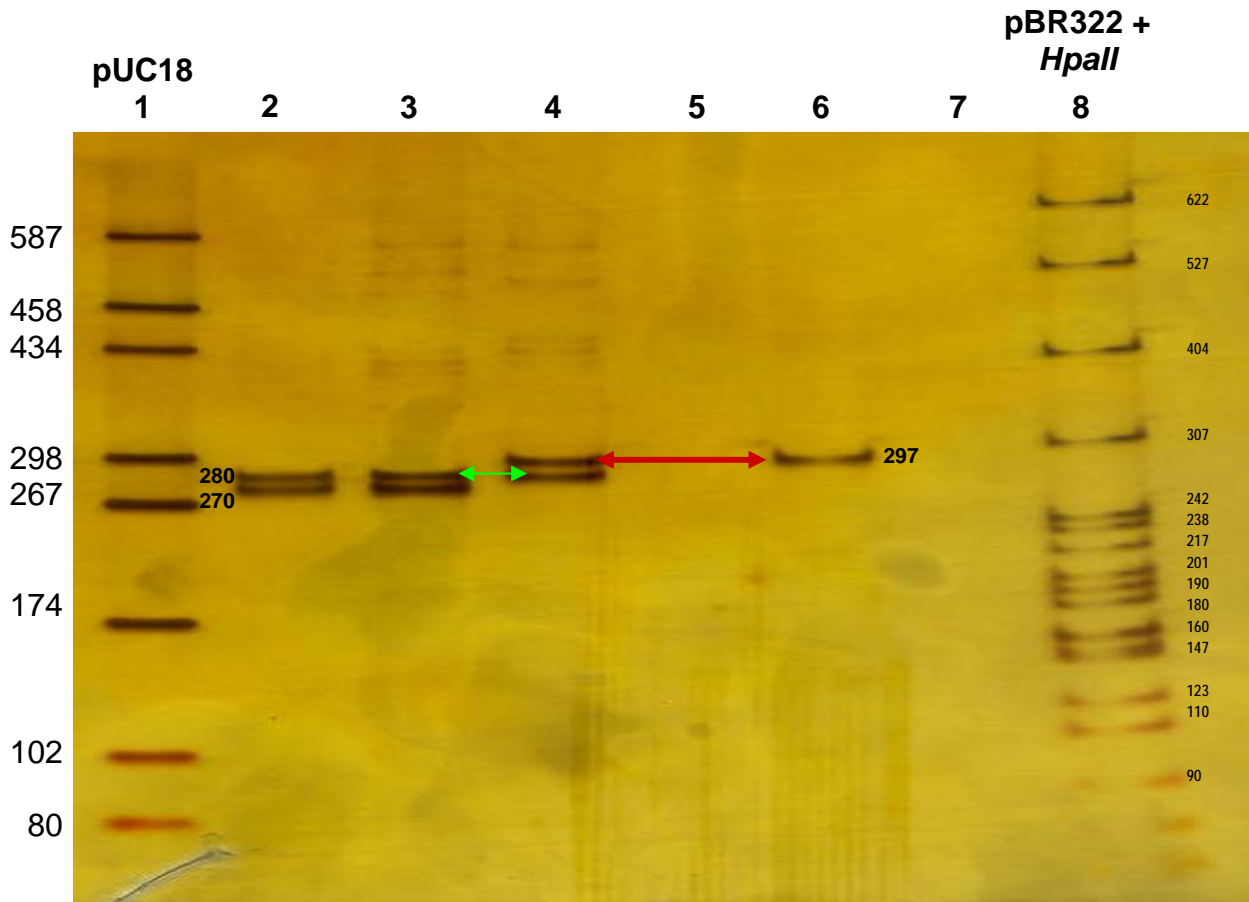


Figura 14. Se muestra gel de poliacrilamida con las muestras en análisis de la paciente y sus padres además de que el primer carril muestra el marcador de peso molecular PUC18 (digerido enzimáticamente con *Hae*III). El carril 2 se encuentra el ADN materno no digerido, en el carril 3 el digerido; en el carril 4 se encuentra el ADN no digerido de la paciente y en el carril 5 el ADN digerido; en el carril 6 el ADN no digerido del padre y en el carril 7 el digerido. En el carril 8 se encuentra el plásmido pBR 322 + *Hpa*II. Los resultados se discuten en el texto.



Como se aprecia en el gel de la Figura 14, en la muestra digerida del padre no hay producto de PCR (que es lo esperado), solo hubo producto en la muestra sin digerir. Esto además corrobora que no hubo digestión parcial (incompleta), lo cual alteraría el resultado.

En la muestra de la madre se distinguen 2 bandas, diferentes en longitud de la única banda del padre, lo que permite su diferenciación.

Sin embargo, en los carriles correspondientes a las muestras de ADN de la hija (paciente), se observa que en la muestra digerida, *no hay producto*, solo en la muestra *No* digerida en la cual se distinguen una banda igual a la del padre (Fig. 14. Flecha roja) y otra igual a una de las 2 que tiene la madre (Figura 14. Flecha verde).

De acuerdo al resultado obtenido, parecería ser que los 2 cromosomas de la paciente (tanto el cromosoma normal como el translocado) permanecen *los dos activados*. El ensayo se hizo tres veces, pero en el gel solo se muestra el tercer ensayo, pero el patrón fue idéntico en los ensayos anteriores.

Debe mencionarse que como control de restricción enzimática en todos los ensayos, siempre se utilizó ADN del plásmido pBR322 cortado con la misma cantidad de enzima para corroborar el funcionamiento de la misma y la uniformidad de las muestras. Esto es parte del control de calidad del procedimiento y siempre se hace de esta manera. Teóricamente es de esperarse que en las translocaciones balanceadas, el cromosoma que lleva el centro de inactivación permanezca activo y el cromosoma normal, sea inactivado preferentemente. Por el resultado de este análisis parecería indicar que los 2 cromosomas X están activos.

## VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se describe a un paciente con HI asociada a t(X;9) y alteración del patrón de inactivación del X en sangre periférica. La HI es un trastorno generalizado de la piel o genodermatosis que se caracteriza por manchas hipopigmentadas en tronco, abdomen y extremidades principalmente que presenta diversas formas desde parches a zig-zag. En el caso de nuestra paciente este patrón de manchas hipopigmentadas correspondía con lo reportado en casos similares teniendo ella estas manchas en abdomen, espalda y miembros inferiores (*Ruggieri et al., 2000*).

Este trastorno se acompaña también de manifestaciones extracutáneas como son alteraciones del sistema nervioso central, principalmente retraso del desarrollo psicomotor y crisis convulsivas de difícil control que se pueden llegar a ver en hasta en un 60 a 70% de los casos. La paciente presenta un retraso en el desarrollo generalizado y crisis convulsivas de difícil control empleándose hasta dos anticonvulsivantes para mejor control, situación que actualmente no se ha logrado por completo. Estas alteraciones se asocian a defectos en la migración neuronal con diversos hallazgos histopatológicos como son áreas heterotópicas, paquigiria, micropoligiria cerebral ó cerebelar (*Pascual-Castroviejo et al., 1997*).

Debe realizarse en estos pacientes una valoración integral ya que como se ha visto anteriormente pueden presentar diversas alteraciones. Un aspecto importante de éstas es el estudio familiar debido a la amplia heterogeneidad etiológica que presenta, de la expresividad de la enfermedad y que podría ser el caso que se tomara la dermatosis como un evento aislado y no dar manejo adecuado para las complicaciones.

En relación a la translocación X;9 con que se asoció este caso, las translocaciones X-autosoma son poco frecuentes con una ocurrencia de 1/30,000 nacimientos. Se ha descrito que en las ocasiones en que el cromosoma translocado sufre lyonización, los genes en el autosoma translocado son también inactivados, si bien la extensión del silenciamiento génico puede ocurrir de manera continua o discontinua (Gupta N et al. , 2006).

El mecanismo que regula la inactivación de los genes en el segmento autosómico no está claro. La asociación de XIST RNA a secuencias contenidas en un cromosoma es fundamental para la lyonización pero no se ha visto en el segmento del autosoma translocado que por lo demás tiene todas las marcas de la inactivación (Gupta N et al., 2006).

En una translocación X;autosoma balanceada el cromosoma X normal es inactivado preferencialmente para prevenir una monosomía deletérea del segmento autosómico translocado. En este sentido, las mujeres portadoras de una translocación X;autosoma balanceada son generalmente fenotípicamente normales. Sin embargo en el caso de que la translocación no esté balanceada los efectos pueden estar mitigados por la inactivación selectiva del X anormal.

La inactivación de un X normal en una translocación no balanceada es posible para dar una ventaja de supervivencia. En las translocaciones X;autosoma no balanceadas, usualmente el cromosoma derivado del X es el inactivo, siempre y cuando el centro de inactivación del X en Xq13 está presente e intacto (Gupta N et al., 2006; Glaser B et al., 2004).

El mecanismo de inactivación del X está asociado a alteraciones de la piel con patrón de herencia ligada al X y se manifiestan notablemente en los patrones de líneas y remolinos descritas por el dermatólogo Alfred Blaschko, éste y otros eventos epigenéticos podrían ayudar a explicar los mecanismos de la enfermedad (Sun y Tsao, 2008). Uno de estos mecanismos es que en el cromosoma X inactivo

los nucleótidos de citosina en los promotores CpG están metilados y por ello silenciados (*Sun y Tsao, 2008*).

La inactivación del X normalmente es 50:50 en las células de un individuo femenino pero esta circunstancia puede estar alterada, un ejemplo es el fenómeno de lyonización, otro evento es la inactivación del X secundaria y no al azar (cuando se hizo una selección al azar al principio pero que eventos posteriores dan ventaja a un tipo de inactivación por ventaja reproductiva celular selectiva). Estas situaciones pueden verse reflejadas en la clínica en que mujeres portadoras de enfermedades recesivas ligadas al X tengan manifestaciones clínicas (*Sun y Tsao, 2008*).

Se sabe también que algunos genes son parcial o totalmente expresados es decir que “escapan” a la inactivación del X de forma total o parcial. Ya que la inactivación preferencial del X se completa después del estadio de blastocisto las manifestaciones de los fenotipos ligados al X dependen mayormente en la forma en como estas células subsecuentemente se dividen, mezclan y migran para formar los órganos del cuerpo. Algunos tejidos del cuerpo son policlonales, es decir que consisten de una mezcla heterogénea de células con cromosomas activos maternos o paternos como es el caso de las vellosidades intestinales.

El patrón de inactivación del X es mejor comprendido gracias al fenotipo visual de los individuos que son portadores de una alteración por ejemplo, las líneas dermatológicas conocidas como líneas de Blaschko, las que se ha sugerido que “mapean” la historia de migración de las células ectodérmicas de la piel conforme migran y proliferan desde las regiones en desarrollo hasta los órganos maduros alternando las líneas (afectada o no afectada) y representando el patrón celular que tienen activado, ya sea el cromosoma normal o el X mutado.

Hatchwell et al en 1996, estudiaron el caso de una paciente con Hipomelanosis de Ito en quien se diagnosticó una translocación constitucional de X;17. Los autores plantearon la hipótesis de que un factor más importante que el lugar del sitio de rompimiento de la translocación (involucrando a Xp11) para que se presentaran las manifestaciones clínicas, era el estatus funcional del X.

El estudio de células de la piel de regiones pigmentadas e hipopigmentadas y de sangre con la técnica de análisis de metilación de la enzima *HpaII* la que está exclusivamente metilada en los cromosomas X inactivos y cercana al sitio polimórfico dentro del gen de receptor de andrógenos (*HUMARA*), demostró que el cromosoma X translocado era activo en el 100% de las células (resultado esperado). Sin embargo el resultado del ADN de las regiones hipopigmentadas demostró un patrón de inactivación indicando que el cromosoma X normal estaba activo en 40% de las células.

Los autores consideraron que existirían al menos dos consecuencias de la presencia de células con un derivado del X inactivo en el tejido afectado: una disomía funcional de Xp y una monosomía parcial variable del 17p. Existen otros casos reportados en donde se ha tratado de descartar las disomías vs las monosomías parciales (*Feldman B et al, 1999; Katz Füller B et al; Gläser B et al 2004*).

En el caso de Hatchwell et al se propuso que las células que han inactivado el derivado del X parecerían tener una disomía funcional de secuencias del X distales al punto de ruptura en Xcen y una monosomía funcional variable de secuencias distales al rompimiento centromérico del cromosoma 17. La presencia de una disomía funcional de secuencias en el X aunque fuese en solo en una pequeña proporción de células puede conferir un fenotipo más severo como sucede en mujeres que tienen anillos del X en que éste no puede inactivarse.

Fritz et al (1998) describieron el caso de una paciente con Hipomelanosis de Ito quien era mosaico para un anillo adicional del cromosoma X, por técnica de FISH demostraron la ausencia del locus XIST en el anillo del X, lo que llevó a la expresión disómica de los genes del X y lo propusieron como la explicación para las diferencias pigmentarias observadas. La presencia de una disomía funcional de Xp en incluso una pequeña proporción de células dará un fenotipo más severo que el esperado.

Un estudio similar fue realizado por Rivera et al (2000) en una paciente con t(X;13) en donde se estudió la posibilidad de un disomía Xp funcional resultado de la inactivación del der(Xq;13p).

Wolf et al (1998) reportaron el caso de una paciente con t(X;9)(q28;q12) en la que se comprobó que debido a los patrones de inactivación del X esta paciente tenía una disomía funcional para Xq28 en algunas de sus células. Se ha reportado que en algunos casos la inactivación falla en expandirse en el segmento autosómico involucrado resultando en una trisomía parcial de esta parte del autosoma (Kalz-Füller B et al, 1999; Popota BC et al, 2006).

Además de considerar las alteraciones clínicas relacionadas con la translocación, Kalz-Füller B et al (1999) realizaron un estudio de 14 pacientes con translocaciones X-autosoma, concluyendo que mientras los varones eran infértiles, la fertilidad en la mujeres portadoras dependía de la posición del punto de rompimiento en la región del cromosoma X. Mujeres fértiles con puntos de ruptura fuera de la región crítica de Xq13-q26 en algunos casos pasaron la translocación a su descendencia. Parte del análisis genético de nuestra paciente incluyó los riesgos para los gametos posibles derivados de la translocación X;9, los cuales se muestran en la Figura 15.

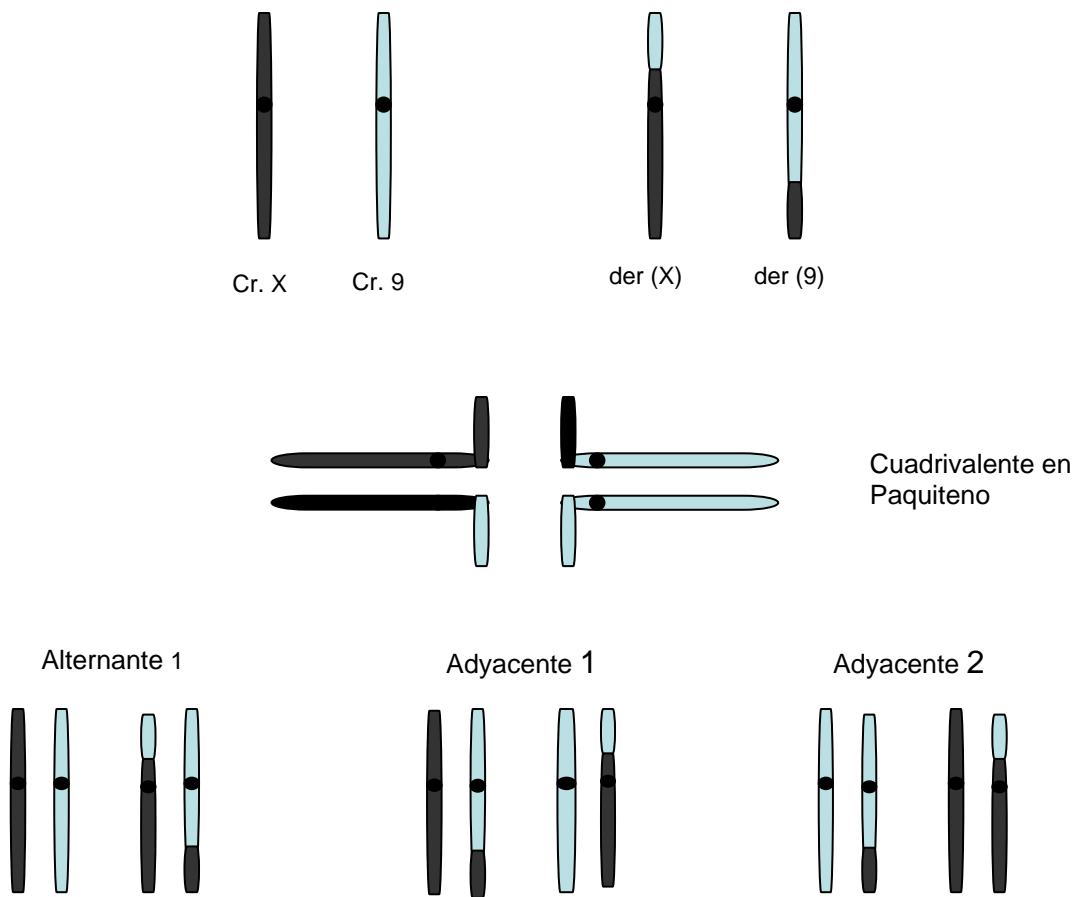


Figura 15. Se muestra la segregación de la translocación (X;9) con la formación del cuadrivalente en paquiteno. La explicación en extenso se da en el texto.

Un aspecto importante de este caso es que al tratarse de un paciente femenino con una translocación los gametos que se producirán al momento de la segregación tendrán complementos cromosómicos desequilibrados. Esto se lleva a cabo en la etapa de paquiteno de la meiosis I, formándose un cuadrivalente, que es el apareamiento de cromosomas homólogos. Cuando estos cromosomas se separan durante la anafase de la meiosis se pueden producir tres posibilidades (Figura 15):

1. Segregación alterna. Un gameto recibirá los dos cromosomas normales y otro la translocación, por lo que será portador de ésta.
2. Adyacente 1. Los cromosomas de la parte superior van hacia un gameto y los de la parte inferior a otro gameto.
3. Adyacente 2. Los dos cromosomas de la izquierda van hacia un gameto y los dos de la derecha hacia otro.

Pero estos aspectos estructurales deben enmarcarse en conjunto con los aspectos epigenéticos.

En la paciente descrita en este trabajo el estudio cromosómico y de metilación fue realizado solamente en células sanguíneas y el estudio cromosómico en células de la piel de regiones tanto hipopigmentadas como normales pero en ellas no se realizó estudio de metilación. El estudio de la paciente con técnica de bandas GTG en cromosomas de sangre y de piel confirmó la presencia de la translocación (X;9), de la cual existen casos descritos que involucran incluso la región Xp11 como es el caso de la proposita. En estos estudios los pacientes han tenido igualmente Hipomelanosis de Ito.

En relación al estudio de metilación del cromosoma X en ADN extraído de sangre periférica, si bien el estudio parecería indicar que ambos cromosomas están activos, esta situación es altamente anormal e inesperada y no hay una explicación que pueda clarificar esta circunstancia. Se propone realizar el estudio de metilación en fibroblastos de piel normal y de piel hipopigmentada para establecer que sucede con la inactivación a estos niveles. Por el momento no se cuenta con una explicación satisfactoria y se requieren más estudios.



## **IX. ANEXOS**

Material y Métodos.

### **I. Técnica de Cariotipo**

Toma de Muestra

Material – Jeringa de 3 ml

Heparina

Equipo – Campana de Flujo Laminar

Método

1. Preparar la jeringa dentro de la campana de flujo laminar, bañando la pared interna de la jeringa con heparina y dejando 0.1 ml al final.
2. Tomar 2 ml de sangre periférica para el estudio, etiquetar la jeringa con el nombre del paciente y el número de registro.
3. Registrar las muestras en la libreta de control.

Método de Cultivo de Sangre

Material – Medio de Cultivo BP Max

PHA (Fitohemaglutinina)

Tubos de Polipropileno

Equipo – Campana de Flujo Laminar

Incubadora

Método

1. Preparar dos tubos por cada muestra, marcados con las letras A y B y el número de registro del laboratorio.
2. En los tubos se colocan 5 ml de medio de cultivo.
3. Inocular en cada tubo 10 gotas de sangre periférica.
4. Incubar el cultivo a 37°C por 72 hrs.

## Cosecha

Material – Puntillas	Colchicina
Micropipeta	Refrigerador
Incubadora	Centrífuga
Vortex	KCl 0.075 M como solución hipotónica
Pipeta	Solución Fijadora (3 partes de metanol absoluto y una parte de Ac. Acético Glacial).
Piseta	

## Método

1. 30 min antes de cosechar agregar 15µl de solución de colchicina
2. Incubar de nuevo por 30 min.
3. Centrífugar 10 min a 2,000 rpm.
4. Remover el sobrenadante, resuspender el botón celular, adicionar lentamente y con agitación 8 ml de solución hipotónica (37°C) é incubar 30 min.
5. Centrífugar 10 min a 2,000 rpm.
6. Remover el sobrenadante, resuspender el botón celular, adicionar lentamente y con agitación constante 8 ml de solución fijadora recién preparada y fría é incubar 20 min a 4°C (Refrigeración).
7. Centrífugar 10 min a 2,000 rpm.
8. Remover el sobrenadante y adicionar con agitación 8 ml de sol. fijadora.
9. Repetir los pasos 7 y 8 hasta obtener un botón blanco.

## Preparación de Laminillas

### Material

Portaobjetos

Agua Fría

Alcohol etílico al 96%

Pipetas

Lápiz punta diamante

Pinzas punta roma

Equipo

Centrífuga

Vórtex

Microscopio

Estufa a 60°C.

Método

1. Sumergir los portaobjetos en alcohol etílico al 96% frío por 30 min.
2. Pasar los portaobjetos a agua fría.
3. Centrifugar 10 min a 2,000 rpm los tubos obtenidos del paso de la cosecha.
4. Resuspender el botón celular en un volumen pequeño de fijador fresco y frío, gotear de 3 a 4 gotas de esta solución en los portaobjetos obtenidos de los pasos 1 y 2. Pasar las laminillas por la flama ligeramente.
5. Dejar secar las laminillas y evaluar la calidad.

Bandas GTG

Material – Buffer de Fosfatos pH 7.

Buffer de Fosfatos pH 6.8.

Solución de Tripsina.

Colorante Giemsa.

Colorante de Wright.

Cronómetro.

Cubreobjetos.

Entellán.

## Método

1. Preparar en 6 Coplin cada una de las siguientes soluciones:
  - 4 ml de solución de tripsina y 96 ml de buffer pH 7.
  - 100 ml buffer pH 7.
  - 100 ml buffer pH 7.
  - 5 ml de colorante Giemsa y 95 ml de buffer pH 6.8.
  - 5 ml de colorante Wright y 95 ml de buffer pH 6.8.
  
2. Sumergir de 20-30 segundos una laminilla en el primer coplin con la solución de tripsina.
3. Enjuagar la laminilla en el segundo coplin (buffer pH 7).
4. Dejar la laminilla 40 segundos en el tercer coplin (buffer pH 7).
5. Sumergir 2 min y medio la laminilla en el cuarto coplin (Colorante de Wright).
6. Sumergir 2 min y medio la laminilla en quinto coplin (Colorante Giemsa).
7. Enjuagar la laminilla con agua, secar y montar con entellán y cubreobjetos.
8. Visualizar al microscopio con diferentes aumentos.

## II. Técnica de cultivo de fibroblastos de piel.

### Materiales

Biopsia de tejido – 2mm de profundidad X 2 mm de diámetro fresco ó refrigerado a 4°C.

Mezcla de solución antibiótica estándar (Ej. GIBCO/BRL PSN).

Medio de cultivo (Ej. GIBCO/BRL).

Placas de petri de 35-mm.

Instrumental de disección: Agujas, tijeras, fórceps finos y bisturí.

Nota: Todas las incubaciones se realizan en una incubadora al 5% de CO<sub>2</sub> humidificada a 37°C.

### Método:

1. Usando los instrumentos de disección se colocan las muestras de tejido en las cajas de petri que contienen la solución antibiótica. Se deja por 30 min.
2. Transferir las muestras a otra caja de petri con 2 ml de medio de cultivo. Cortar las muestras en fragmentos finos.
3. Transferir pedazos pequeños de tejido y una cantidad pequeña del medio de cultivo (1 ml por cada frasco) a 2 ó 3 frascos de plástico utilizando una pipeta Pasteur estéril.
4. Con cuidado colocar los frascos en una gradilla, cerrar la tapa e incubar por varias horas por la noche.
5. Adicionar 4 ml de medio de cultivo con cuidado dentro de los frascos. Cerrarlos e incubarlos por 2 días.
6. Examinar si hay evidencia de contaminación como apariencia turbia, acidez del medio de cultivo ó crecimiento fúngico. Si no hay nada de esto se continua la incubación.
7. Después de 5 días, se revisa el crecimiento.

8. Cuando comienza el crecimiento, se reemplaza el medio 2 veces por semana. Cuando varias colonias están expandidas se cosecha directamente del cultivo inicial y se preparan los cromosomas para metafase.
9. Realizar bandeo cromosómico y análisis al microscopio.

### III. Técnica de FISH

La hibridación *in situ* fluorescente (**FISH** por sus siglas en inglés) es un método altamente sensible y específico de detección de secuencias de ácidos nucleicos. Generalmente la sonda que se utiliza para FISH es una secuencia genómica de la región de interés la cual se clona como inserto en un vector que hibrida a la región homóloga del par de cromosomas en estudio.

En la realización de la técnica de FISH se usan sondas de DNA marcadas con fluorescencia, ésta puede llevarse al cabo en células, núcleos o cromosomas de metafases que se obtengan tanto de cultivo como de biopsia que pueden provenir de especímenes frescos, refrigerados o fijados; las preparaciones se analizan en portaobjetos observadas en microscopio de epifluorescencia. (Nussbaum R, 2001)  
El procedimiento básico para realizar la técnica de FISH se divide en 6 pasos:

1. Preparación de la laminilla
2. Preparación de la sonda
3. Hibridación
4. Lavado
5. Contra-tinción
6. Visualización

Se requiere del siguiente material para llevar a cabo la técnica:

- Formamida
- 20x SSC
- Sonda de locus específico: LSI® BCR/ABL DC, SF Translocation Probe Set.
- Sonda WCP Spectrum Green Probe para el cromosoma X.
- Buffer para la sonda
- Etanol
- NP-40 1000 ul
- DAPI II

La razón por la que se utilizó la sonda LSI® BCR/ABL DC, SF fue para identificar la región 9q34 que en el caso de nuestra paciente, se encontraba involucrada en la translocación. Esta sonda comienza entre los exones 4 y 5 del gen ABL, se extiende alrededor de 300 kb en dirección a telómero. La sonda WCP para el cromosoma X, hibrida en Xp, Xq y centrómero, permite una identificación completa de la estructura del cromosoma X dando una mediana a alta intensidad (Fig. 17).

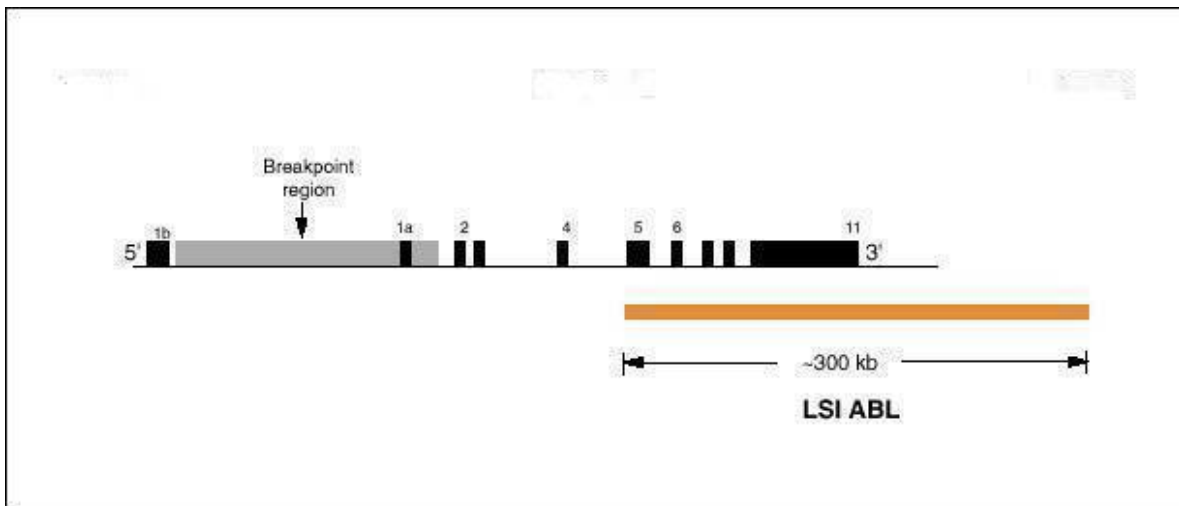


Figura 17. Ideograma del cromosoma 9 mostrando las regiones de hibridación de la sonda LSI® BCR/ABL DC, SF Vysis ® Catálogo Vysis 2005.

### Preparación de la laminilla.

Las células son tratadas para facilitar la disrupción de la membrana celular. Para la obtención de cromosomas en metafase o profase para la técnica de FISH se siguen los protocolos citogenéticos estándar de cultivo, cosecha y preparación de laminillas. Las laminillas se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una semana, se revisa por contraste de fase para seleccionar un campo apropiado, se deshidratan en etanol al 70%, al 85% y al 100% por un minuto en cada concentración.



## **Desnaturalización.**

Las sondas de DNA usadas para realizar la técnica de FISH contienen una marca que permite su detección después de la hibridación con el DNA blanco de interés. Las sondas son marcadas por dos vías de acuerdo al fabricante (manual de Vysis ®). El marcaje directo de la sonda es el más avanzado y simple, se adicionaron por cada área blanco en un tubo de microcentrífuga a temperatura ambiente los siguientes reactivos:

- ✓ 7 µl LSI de buffer de hibridación
- ✓ 0.5 µl de sonda.
- ✓ 2.5 µl H<sub>2</sub>O purificada

## **Hibridación.**

La mezcla total de 10 µl se adicionó al DNA blanco en la laminilla y posteriormente se selló el área de hibridación con un cubreobjetos y cemento LILI®. La laminilla preparada con la sonda y el DNA blanco fueron desnaturalizados térmicamente. A continuación se colocaron las laminillas en un aparato HYBRITE de Vysis ®. La reacción fue llevada a 37°C por 24 hrs.

## **Lavado.**

El exceso de sonda fue eliminado con las siguientes soluciones:

- ✓ 70 ml de 0.4XSSC/0.3% NP-40 en un vaso de Coplin.
- ✓ 70 ml de 2XSSC/0.1% NP-40 en un vaso de Coplin.

Se pusieron a una temperatura de  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  en baño maría por 30 minutos. Después de remover el cubreobjetos de la laminilla se sumergieron inmediatamente en la solución de 0.4XSSC/0.3% NP-40, agitándose de 1-3 segundos y sacándolas después de dos minutos para después sumergirlas en la solución de 2XSSC/0.1% NP-40, se agitaron por 2 segundos y después de 1 minuto se sacaron permaneciendo a temperatura ambiente para su secado.

### **Contratinción.**

Se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  de DAPI II para luego colocar un cubreobjetos.

### **Visualización.**

Se hizo la observación de la laminilla en un microscopio de epifluorescencia Zeiss modelo Imagen.A1 AX10.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Smeets D, F.C.M. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry* 2004, 37 pp. 439-446.
2. Moore CM, Best RG. Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001, pp. 1-8.
3. Savage JRK. Chromosome Rearrangements. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001, pp. 1-7.
4. Gollin SM, Reshmi SS. Mitosis: Chromosomal Rearrangements. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005, pp. 1-5.
5. Luthardt F, Keitges E. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001, pp. 1-12.
6. Patsalis P.C. Complex Chromosomal Rearrangements. *Genetic Counseling*, Vol. 18, No.1, 2007, pp. 57-69.
7. Lindsay SJ, Khavaji M, Lupski J, Hurles M. A Chromosomal Rearrangement Hotspot can be Identified from Population Genetic Variation and is Coincident with a Hotspot for Allelic Recombination. *The American Journal of Human Genetics*. 2006, Vol. 79, pp. 890-902.
8. Shaw CJ, Lupski J. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics*. 2004, Vol. 13, pp. 57-64.
9. Thomas S, Durkie M, Van ZB, Sanford R, Potts G, Youings S, Jacobs P. Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Human Genetics*. 2006, pp. 1-7.
10. Marchetti F, Wyrobek A. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Research (Part C)*, 2005, 75: 112-129.
11. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular Mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000;34:297-329.

12. Speicher MR. Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) Techniques. Encyclopedia of Life Sciences. 2005, pp. 1-7.
13. Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ Hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*. 2005, pp. 2833-2838.
14. Darai-Ramqvist E, de Stahl Díaz T, Sandlund A, Mantripragada K, Klein G, Kost-Alimova M. Array CGH and multipoint FISH to decode complex chromosomal rearrangements. *BMC Genomics*. 2006, 7:330.
15. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. *Annu, Rev. Genet*. 2000. 34:297-329.
16. Ruggieri M, Pavone L. Hypomelanosis of Ito: Clinical Syndrome or Just Phenotype?. *Journal of Child Neurology* 2000. Vol. 15, Number 10 pp. 635-644.
17. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229-1239.
18. Hatchwell E, Robinson D, Crolla J, Cockwell A. X inactivation analysis in a female with hypomelanosis of Ito associated with a balanced X;17 translocation: evidence for functional disomy of Xp. *J Med Genet* 1996;33:216-220.
19. Wolff DJ, Schwartz S, Montgomery T, Zackowski JL. Random X Inactivation in a girl with a balanced t(X;9) and an abnormal phenotype. *Am J Med Genet* 1998;77:401-404.
20. Feldman B, Kramer R, Ebrahim S, Wolff DJ, Evans MI. Prenatal Evaluation of a de novo X;9 translocation. *Am J Med Genet* 1999;85:476-478.
21. Gläser B, Shirneshan K, Bink K, Kehrer-Sawatzki H, Bartz U, Zoll B, Bohlander SK. Molecular Cytogenetic Analysis of a de novo balanced X;Autosome Translocation: Evidence for predominant inactivation of the derivative X chromosome in a girl with multiple malformations. *Am J Med Genet* 2004;126A:229-236.

22. Kalz-Füller, Slegers E, Schwanitz G, Schubert R. Characterisation, phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. *Clin Genet* 1999;55:362-366.
23. Gupta N, Goel H, Phadke S, Unbalanced X; Autosome Translocation. *Ind J of Pediatrics* 2006;73:840-842.
24. Rivera H, Correa-Cerro L, Robinson D, Crolla J. Functional Xp Disomy and Hypomelanosis of Ito. *Arch of Med Res* 2000;31:88-92.
25. Panasiuk B, Usinskiene R, Kostyk E, Rybalko A, Stasiewicz-Jarocka B, Krzykwa B, Pienkowska-Grela B, Kucinskas V, Michalova K, Midro Alina. Genetic counseling in carriers of reciprocal chromosomal translocations involving short arm of chromosome X. *Annales de Génétique* 2004;47:11-28.
26. Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Current Opinion in Cell Biology* 2004. Vol. 16, pp. 247-255.
27. Bilyana C. Popova, Takashi T, Nobuo Takagi, Neil Brockdorff, Nesterova Tatyana. Attenuated spread of X-inactivation in an X;autosome translocation. *National Academy of Sciences* 2006, Vol. 103, No. 20, pp. 7706-7711.
28. Sun Bryan K, Tsao H. X-chromosomal inactivation and skin disease. *Journal of Investigative Dermatology* 2008. pp. 1-6.
29. Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A. *Xist* and the order of silencing. *EMBO Reports* 2007, Vol. 8, No. 1, pp. 34-39.
30. Taibjee, S.M, Bennet D.C, Moss C. Abnormal pigmentation in hypomelanosis of Ito and pigmentary mosaicism: the role of pigmentary genes. *British Journal of Dermatology* 2004; 151: 269-282.
31. Gartler S.M, Goldman M.A. X-chromosome inactivation. *Encyclopedia of Life Sciences* 2005; pp. 1-7.
32. Duthie S.M, Mechanisms of X-Inactivation. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001; pp. 1-7.
33. Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA *et al.* *BRCA1* supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002, 111:393-405.

34. Lakshmi NC, Costanzi C, Leu NA *et al.* Developmental Changes in Histone macroH2A1-Mediated Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 2007. Vol. 27, No. 7. 2758-2764.
35. Keohane AM, Barlow A, Waters J *et al.* H4 acetylation, *XIST* RNA and replication timing are coincident and define X;autosome boundaries in two abnormal X chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 1999. Vol. 8, No. 2. 377-383.
36. Heard E, Rougeulle C, Arnaud D *et al.* Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X-inactivation. *Cell* 2001, Vol. 107: 727-738.
37. Strachan T, Read A. *Genética Humana 3a. Edición* 2004. Editorial Mc Graw-Hill. pp: 65.
38. Franco B. Chromosome X. *Encyclopedia of Life Sciences* 2005. pp: 1-10.
39. Morrow B. Microdeletions and microduplications: Mechanism. *Encyclopedia of Life Sciences* 2005. pp: 1-5.
40. Salstrom J. X-inactivation and the dynamic maintenance of gene silencing. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007, Vol. 92: 56-62.
41. Mwaniki M, *et al.* Hypomelanosis of Ito: A case report from East Africa. *African Journal of Neurological Sciences* 2006. Vol. 95: 60-63.
42. Pascual-Castroviejo I, Roche C, Martínez-Bermejo A, Arcas J, López-Martín V, Tendero A, Esquiroz J, Pascual-Pascual SI. Hypomelanosis of Ito. A study of 76 infantile cases. *Brain & Development* 1998. Vol. 20: 36-43.
43. Hsu TC. Mammalian chromosomes in vitro: I. The karyotype of man. *J Hered* 1952;43:167-72.
44. Tjio JH, Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas* 1956;42:1-6.
45. Fritz B, Küster W, Orstavik KH, Spranger J, Rehder H. Pigmentary mosaicism in hypomelanosis of Ito. Further evidence for functional disomy of Xp. *Human Genetics* 1998. Oct;103(4);441-449.
46. Royce-Tolland M, Panning B. X Inactivation: It takes two to count. *Current Biology* 2008. Vol. 18 No. 6, R255-R256.
47. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).