



ARTIGO ESPECIAL

Abordagens experimentais para avaliar melanócitos em mosaico no vitiligo segmentar ☆,☆☆



Gerson Dellatorre ^{ID} ^a, Vinicius M. Fava ^{ID} ^b, Marcelo Távora Mira ^{ID} ^{a,c,d} e Caio Cesar Silva de Castro ^{ID} ^{a,e,*}

^a Hospital Santa Casa de Misericórdia, Curitiba, PR, Brasil

^b Doenças Infecciosas e Imunidade no Programa de Saúde Global, The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canadá

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

^d Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

^e Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Recebido em 16 de março de 2022; aceito em 26 de maio de 2022

PALAVRAS-CHAVE

Genética;
Mosaicismo;
Vitiligo

Resumo O vitiligo é doença autoimune da pele que resulta em máculas brancas localizadas ou disseminadas. Uma característica comum de vários protocolos de classificação existentes é a distribuição da doença em dois subtipos principais, vitiligo não segmentar (VNS) e vitiligo segmentar (VS). O VS é caracterizado pela despigmentação que se espalha em um ou mais segmentos da pele, enquanto o VNS é disseminado. Várias observações clínico-epidemiológicas sugerem que o VS tem fisiopatologia autoimune distinta em relação ao VNS. Além disso, o padrão de distribuição clínica das lesões de VS assemelha-se muito a outras doenças com mosaicismo de melanócitos. Essas observações levam à suposição de que o VS seja causado por reação autoimune localizada direcionada ao mosaicismo de melanócitos epidérmicos. Aqui, os autores propõem exemplos de abordagens experimentais para avaliar o mosaicismo em pacientes com VS.

© 2022 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2022.05.001>

☆ Como citar este artigo: Dellatorre G, Fava VM, Mira MT, Silva de Castro CC. Experimental approaches to assess melanocytes mosaicism in segmental vitiligo. An Bras Dermatol. 2023;98:217–21.

☆☆ Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: caio.castro@pucpr.br (C.C. Silva de Castro).

Introdução

De acordo com consenso internacional, o vitiligo é classificado em três grupos principais: vitiligo segmentar (VS), não segmentar (VNS) e misto (coexistência de VS e VNS).¹ O consenso descreve o VS como despigmentação que se espalha dentro do segmento, uni, bi ou pluri-segmentar; entretanto, essa distribuição pode ocasionalmente ser bilateral.^{1,2} O padrão de distribuição segmentar não é a única diferença entre o VS e VNS (tabela 1). A mediana da idade de início do VS é de 16 anos, em média oito a dez anos antes da mediana da idade de início do VNS.³⁻⁵ Além disso, a despigmentação no VS geralmente tem progressão rápida, com curso de tempo limitado entre seis a 24 meses, raramente se estendendo após esse período, enquanto o VNS é crônico, apresentando evolução incerta ao longo da vida.^{1,6} Em contraste com o VNS, o VS apresenta envolvimento precoce dos melanócitos dos folículos pilosos; até 50% dos pacientes com VS apresentam poliose na área afetada.¹ A prevalência de distúrbios autoimunes concomitantes (p. ex., tireoidite) é menor no VS.^{3,7} VS e VNS também diferem em relação à resposta ao tratamento: em geral, os pacientes com VS têm resposta deficiente à fototerapia em comparação com o VNS, possivelmente em decorrência da depleção da reserva folicular no primeiro.^{8,9} Por outro lado, pacientes com VS têm resposta excelente e em longo prazo a intervenções cirúrgicas, como transplante de melanócitos-queratinócitos.^{10,11} O sucesso em longo prazo da terapia de transplante no VS sugere defeito limitado do metabolismo dos melanócitos-queratinócitos.¹⁰

Os relatos sugerem diferenças nos mecanismos biológicos subjacentes à patogênese do VS em comparação com o VNS. Por exemplo, os níveis séricos de TWEAK (indutor fraco de apoptose semelhante ao fator de necrose tumoral) foram significativamente mais altos em pacientes com VS em comparação com pacientes com VNS.¹² Além disso, foi demonstrado que o TWEAK é um biomarcador com 100% de sensibilidade e 80,1% de especificidade para diferenciar VS de VNS.¹² Em contraste com o VNS, o estresse oxidativo sistêmico tem contribuição fraca e limitada para a patogênese do VS.^{13,14} No VS, aumento significativo de marcadores induzidos por estresse (p. ex., mitocondrial, HSP70 e CXCL16) foi observado apenas na pele perilesional, sugerindo mecanismo patogênico localizado que promove a despigmentação. A análise imunofenotípica de

células imunes circulantes em pacientes com VS identificou células T reguladoras (Tregs) inalteradas em comparação com controles saudáveis, enquanto os pacientes com VNS apresentaram níveis reduzidos de Tregs.¹⁵ Coletivamente, várias evidências indicam imunidade sistêmica inalterada em pacientes com VS e apontam para uma reação citotóxica localizada direcionada aos melanócitos epidérmicos.¹⁵ Em conjunto, essas diferenças e a notável semelhança do padrão de distribuição do VS com as doenças melanocíticas em mosaico (como lentiginose segmentar e nevo epidérmico verrucoso) levam à hipótese do envolvimento do mosaicismo somático na patogênese do VS.^{16,17}

Como testar a hipótese

Mosaicismo designa indivíduos que englobam pelo menos duas populações de células derivadas de um único zigoto, mas com genótipos ou perfis epigenéticos distintos.¹⁸ A apresentação fenotípica de uma doença causada por mosaicismo genético é condicionada pelo tipo de variação e fase de desenvolvimento em que ocorreu uma mutação somática.¹⁹ As variantes que levam ao mosaicismo genético compreendem duplicações cromossômicas, translocações de segmentos, variação do número de cópias (VNC), variantes de nucleotídeo único (SNV – *single-nucleotide variants*) ou alterações epigenéticas, como alterações transcricionais decorrentes de inserções por retrotransposição. A fase embrionária e o estado de diferenciação celular onde ocorreu uma mutação *de novo* ou retrotransposição delineiam a extensão dos tecidos/células envolvidos no mosaicismo. A hipótese a ser testada sugere que o mosaicismo genético no VS ocorreu em algum momento durante a diferenciação da pele/melanócitos. Diferentes abordagens podem ser aplicadas para testar a hipótese de mosaicismo no VS, cada uma visando detectar um tipo distinto de mosaicismo. Aqui são propostos exemplos adaptando desenhos aplicados para estudar a resposta do hospedeiro a infecções, detectar mutações somáticas no câncer e avaliar o desenvolvimento embrionário.²⁰⁻²³

Contraste pareado de pele perilesional e pele saudável contralateral no VS

A detecção de mosaicismo em doenças humanas pode ser um desafio, pois o número de células de mosaico no tecido alvo pode ser pequeno. Além disso, os melanócitos em mosaico

Tabela 1 Características do vitiligo segmentar e não segmentar

	Segmentar	Não segmentar
Mediana da idade de início	Início mais cedo	Início mais tardio
Associação com doenças autoimunes	Menos frequente	Frequente
Papel do envolvimento precoce do estresse oxidativo	Desconhecido	Presente
Manifestação clínica	Segmentar, unilateral	Variada
Curso	Curto e limitado	Crônico e instável
Níveis séricos de TWEAK	Mais altos	Mais baixos
Tregs	Não afetadas	Diminuídas
Depleção de melanócitos no folículo (poliose)	Frequente	Menos frequente
Resposta a terapias clínicas	Deficiente	Moderada/boa
Resposta em longo prazo ao procedimento de transplante de melanócitos-queratinócitos	Melhor	Pior

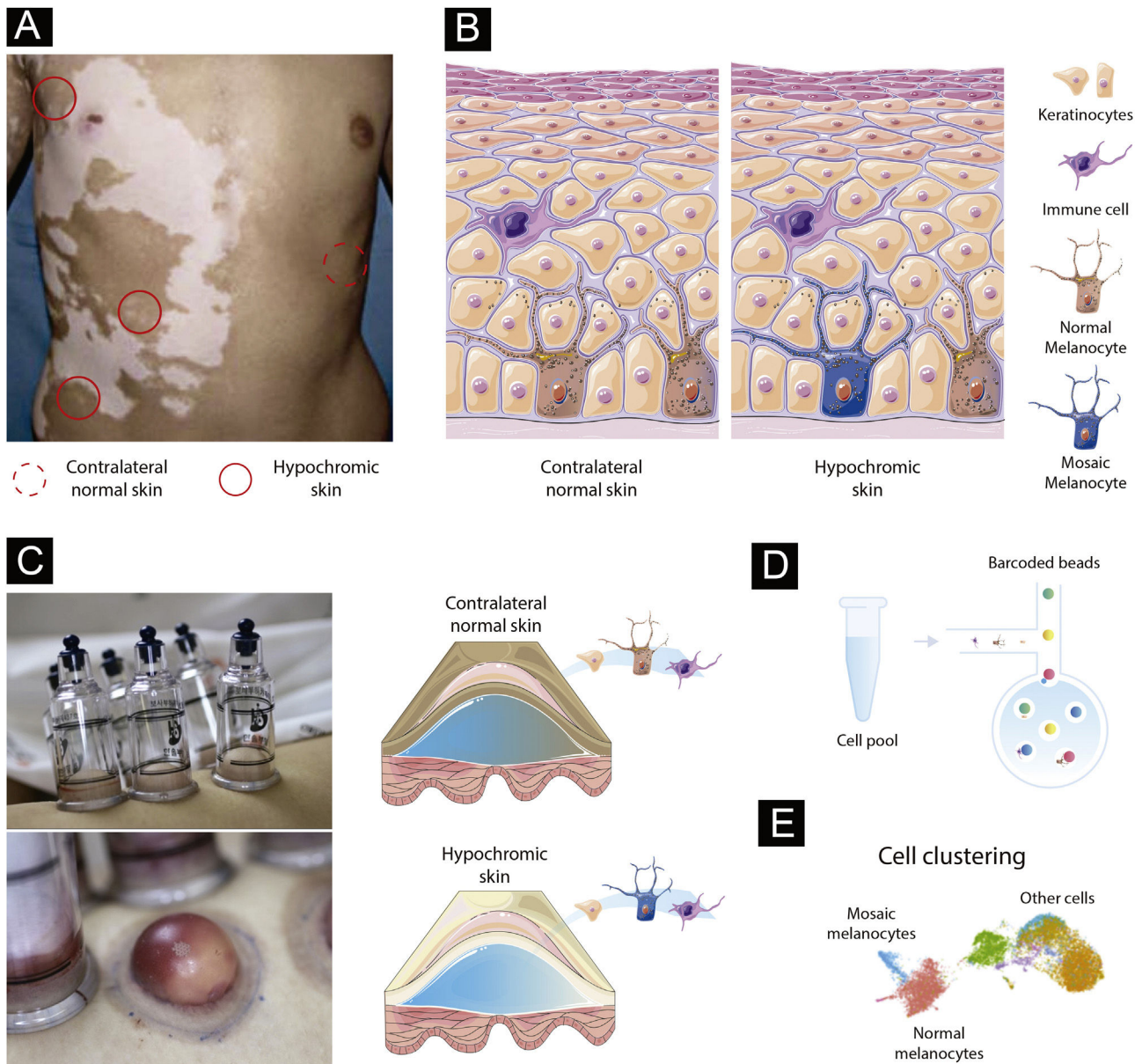


Figura 1 Desenho experimental para testar a hipótese do mosaïcismo no vitiligo segmentar. (A) Representação de paciente com vitiligo segmentar. Áreas hipocrômicas destacadas com um círculo vermelho completo seriam avaliadas quanto à presença de melanócitos em mosaico. Amostra de pele contralateral marcada com círculo pontilhado seria usada como controle interno. (B) Composição cutânea para pele contralateral e hipocrômica. A pele hipocrômica inclui melanócitos em mosaico residuais. (C) Técnica de bolhas de sucção subepidérmica de pele normal e afetada. A tripsinização do teto da bolha possibilita o desprendimento de queratinócitos e melanócitos, que podem estar junto com células imunoinfiltradas, utilizadas nos experimentos com células únicas. (D) Código de barras de célula única. O conjunto contendo a suspensão de células para a pele normal e afetada seria carregado no canal de célula única. Células individuais seriam incorporadas em gotículas de óleo e marcadas com esferas com código de barras exclusivos, o que possibilitaria a aplicação de diferentes conjuntos de abordagens de célula única, incluindo scWGS, scRNA e scATAC. (E) *Cluster* de células utilizando dados ômicos. A análise de *clusters* agruparia células que compartilham estados semelhantes e identificaria melanócitos em mosaico, bem como outros tipos de células incluídos no tecido da bolha.

provavelmente estariam ausentes nas lesões de VS existentes, pois a perda de melanócitos é a causa do vitiligo. Portanto, métodos de alta resolução ao nível de célula única podem ser necessários para detectar populações de células sub-representadas.²⁴ Para detectar possíveis células em mosaico, seria necessário avaliar o tecido obtido de regiões

hipocrômicas da pele de indivíduos no estágio inicial do VS (fig. 1A). Uma vantagem de estudar a hipótese do mosaïcismo no VS é a possibilidade de usar controles internos, uma vez que o VS geralmente é restrito a um segmento unilateral: se a mutação *de novo* ocorreu durante a diferenciação da pele em um segmento, a pele saudável contralateral poderia

ser usada para estabelecer o perfil “normal” do melanócito (fig. 1A). Essa estratégia permitiria controlar os efeitos de confusão causados pela variabilidade interindividual ao combinar vários casos de VS.²⁵

Preparação do tecido alvo

Os melanócitos representam ~2,8% da população de células na epiderme e existem aproximadamente 1.200 melanócitos por mm² de pele, independentemente da etnia do indivíduo (fig. 1B).²⁶ Para capturar um número representativo de melanócitos em mosaico viáveis para a análise de célula única, áreas hipocrômicas de VS ativo de início precoce precisariam ser identificadas utilizando a lâmpada de Wood. A amostragem de queratinócitos-melanócitos dessas áreas pode ser realizada com uma técnica de enxertia epidérmica por bolhas de sucção com tripsinização subsequente do teto da bolha para destacar as células em suspensão (fig. 1C).²⁷ Uma vantagem de coletar epiderme usando a bolha de sucção é a ampliação da área amostrada, o que aumenta a probabilidade de capturar melanócitos em mosaico viáveis remanescentes – é uma técnica quase sem cicatrizes, o que facilita a inclusão de pacientes.²⁸ Para avaliar melanoblastos foliculares não capturados pelo método da bolha de sucção, a técnica por *punch* também pode ser utilizada. A biópsia por *punch* é mais invasiva do que a bolha, e a proporção geral de melanoblastos capturados seria pequena. No entanto, refinamentos metodológicos de análise de célula única podem permitir em um futuro próximo o estudo de populações de células menores.

Identificando células em mosaico no vitiligo segmentar por meio de variações genéticas e epigenéticas

Para avaliar a presença de melanócitos em mosaico, a seleção por amostragem celular ativada por fluorescência pode ser usada para separar a fração de melanócitos em tecido de bolhas ou melanoblastos em biópsias por *punch*. Em seguida, seria realizado o sequenciamento do genoma completo (WGS – *whole genome sequencing*) utilizando DNA extraído de melanócitos da pele hipocrômica e contralateral dos mesmos indivíduos. As variantes detectadas em tecidos contralaterais seriam utilizadas para excluir variantes germinativas. Algoritmos projetados para detectar células tumorais, como MuTect2,²⁹ ou específicos para células em mosaico, como MosaicForecast³⁰ e DeepMosaic,³¹ poderiam ser usados para detectar mutações somáticas. A limitação da abordagem em massa é a incapacidade de separar as células em mosaico dos melanócitos regulares e avaliar sua interação com outras células. Abordar essa limitação exigiria tecnologias de sequenciamento de célula única (*sc – single-cell*) avaliando o perfil de sequência transcriptômica, epigenética ou de DNA de células individuais (fig. 1D).³² Os scWGS possibilitam a avaliação da variação estrutural, VNC e SNV em células individuais. Um método scWGS de alto rendimento desenvolvido para detectar mutações subclonais em câncer pode ser usado para testar a hipótese de mosaicismo de melanócitos.²² No VS, as células do mosaico compartilhariam um estado (isto é, variantes genéticas específicas) que poderia ser usado para agrupar células em

clusters e definir a proporção e o tipo de variantes genéticas presentes nas células do mosaico (fig. 1E).³³ O mosaicismo epigenético no VS pode ser testado usando abordagem multiômica com medidas transcriptômicas (scRNA) e de acessibilidade da cromatina (scATAC). Abordagens multiômicas estão sendo utilizadas atualmente para estudar um conjunto diversificado de doenças.³⁴ Análises de scRNA e scATAC podem ser usadas para identificar células de mosaico por meio de semelhanças transcriptômicas e epigenômicas com ferramentas como Seurat,³⁵ Monocle³⁶ e Cicero.³⁷ Abordagem semelhante de scRNA aplicada para estudar embriões humanos foi capaz de detectar com sucesso o mosaicismo.²⁰ Uma vantagem da célula única em comparação com as abordagens em massa é a capacidade de estudar a relação entre as células presentes no tecido da bolha ou nas biópsias por *punch*. De fato, o estudo de scRNA de tecido de bolhas mostrou a recuperação de melanócitos de lesões de VNS.²⁴ A aplicação da abordagem de célula única para estudar o VS pode testar a hipótese do mosaicismo ao avaliar o perfil imunológico local, como demonstrado para o VNS.²⁴

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Gerson Dellatorre: Concepção do estudo, redação e aprovação final do manuscrito.

Vinicius Medeiros Fava: Concepção do estudo, redação e aprovação final do manuscrito.

Marcelo Távora Mira: Redação e aprovação final do manuscrito.

Caio Cesar Silva de Castro: Concepção do estudo, redação e aprovação final do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CCE, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2012;25:E1–13.
2. Correia LD, Castro CCS. Association between bilateral segmental vitiligo and lichen striatus: an expression of mosaicism? *Int J Dermatol*. 2018;57:992–3.
3. Castro CCS, Nascimento LM, Olandoski M, Mira MT. A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population. *J Dermatol Sci*. 2012;65:63–7.
4. Jin Y, Roberts GHL, Ferrara TM, Ben S, van Geel N, Wolkerstorfer A, et al. Early-onset autoimmune vitiligo associated with an enhancer variant haplotype that upregulates class II HLA expression. *Nat Commun*. 2019;10:391.
5. Hann SK, Lee HJ. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35:671–4.
6. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *Lancet*. 2015;386:74–84.

7. Gill L, Zarbo A, Isedeh P, Jacobsen G, Lim HW, Hamzavi I. Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: A cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74:295–302.
8. Anbar TS, Westerhof W, Abdel-Rahman AT, El-Khayyat MA. Evaluation of the effects of NB-UVB in both segmental and non-segmental vitiligo affecting different body sites. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006;22:157–63.
9. Cheng YP, Chiu HY, Jee SH, Tsai TF. Excimer light phototherapy of segmental and non-segmental vitiligo: experience in Taiwan. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2012;28:6–11.
10. Silpa-Archa N, Griffith JL, Huggins RH, Henderson MD, Kerr HA, Jacobsen G, et al. Long-term follow-up of patients undergoing autologous noncultured melanocyte-keratinocyte transplantation for vitiligo and other leukodermas. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77:318–27.
11. Altalhab S, AlJasser MI, Mulekar SV, Issa AA, Mulekar S, Diaz J, et al. Six-year follow-up of vitiligo patients successfully treated with autologous non-cultured melanocyte-keratinocyte transplantation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:1172–6.
12. El-Taweel AEAI, Abdelrahman AMN, Sabry S, Salem RM, Serum TWEAK: A cutoff between segmental and nonsegmental vitiligo. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20:1017–21.
13. Li B, Yi X, Zhuang T, Zhang S, Li S, Yang Y, Cui T, et al. RIP1-Mediated Necroptosis Facilitates Oxidative Stress-Induced Melanocyte Death. Offering Insight into Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2021;141:2921–31.
14. Schallreuter KU, Salem MAEL, Holtz S, Panske A. Basic evidence for epidermal H2O2/ONOO(-) - mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H2O2 with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. *FASEB J.* 2013;27:3113–22.
15. Willemsen M, Post NF, van Uden NOP, Narayan VS, Chielie S, Kemp EH, et al. Immunophenotypic analysis reveals differences in circulating immune cells in peripheral blood of segmental and non-segmental vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2022;142:876–83, e3.
16. Taïeb A, Morice-Picard F, Jouary T, Ezzedine K, Cario-André M, Gauthier Y. Segmental vitiligo as the possible expression of cutaneous somatic mosaicism: implications for common non-segmental vitiligo. *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2008;21:646–52.
17. van Geel N, Speeckaert R, Melsens E, Toelle SP, Speeckaert M, De Schepper S, et al. The distribution pattern of segmental vitiligo: clues for somatic mosaicism. *Br J Dermatol.* 2013;168:56–64.
18. Martinez-Glez V, Tenorio J, Nevado J, Gordo G, Rodríguez-Laguna L, Feito M, et al. A six-attribute classification of genetic mosaicism. *Genet Med.* 2020;22:1743–57.
19. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet.* 2013;14:307–20.
20. Starostik MR, Sosina OA, McCoy RC. Single-cell analysis of human embryos reveals diverse patterns of aneuploidy and mosaicism. *Genome Res.* 2020;30:814–25.
21. Luquette LJ, Bohrsen CL, Sherman MA, Park PJ. Identification of somatic mutations in single cell DNA-seq using a spatial model of allelic imbalance. *Nat Commun.* 2019;10:3908.
22. Laks E, McPherson A, Zahn H, Lai D, Steif A, Brimhall J, et al. Clonal Decomposition and DNA Replication States Defined by Scaled Single-Cell Genome Sequencing. *Cell.* 2019;179:1207–21, e22.
23. Fava VM, Bourgey M, Nawarathna PM, Orlova M, Cassart P, Vinh DC, et al. A system biology approach identifies candidate drugs to reduce mortality in severely ill patients with COVID-19. *Sci Adv.* 2022;8:eabm2510.
24. Gellatly KJ, Strassner JP, Essien K, Refat MA, Murphy RL, Coffin-Schmitt A, et al. scRNA-seq of human vitiligo reveals complex networks of subclinical immune activation and a role for CCR5 in Treg function. *Sci Transl Med.* 2021;13:eabd8995.
25. Correa-Macedo W, Fava VM, Orlova M, Cassart P, Olivenstein R, Sanz J, et al. Alveolar macrophages from persons living with HIV show impaired epigenetic response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 2021;131:e148013.
26. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30:30–41.
27. Tovar-Garza A, Hinojosa JA, Hynan LS, Pandya AG. Noncultured epidermal suspension grafting using suction blisters as donor tissue for vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 2001;9(80):1152–4.
28. Dellatorre G, Bertolini W, Castro CCS. Optimizing suction blister epidermal graft technique in the surgical treatment of vitiligo. *An Bras Dermatol.* 2017;92:888–90.
29. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, Getz G, Stewart C, Linchenshtein L. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2. *bioRxiv.* 2019:1–8.
30. Dou Y, Kwon M, Rodin RE, Cortés-Ciriano I, Doan R, Luquette LJ, et al. Accurate detection of mosaic variants in sequencing data without matched controls. *Nature biotechnology.* 2020;38:314–9.
31. Yang X, Xu X, Breuss MW, Antaki D, Ball LL, Chung C, et al. DeepMosaic: Control-independent mosaic single nucleotide variant detection using deep convolutional neural networks. *bioRxiv.* 2021:1–38.
32. Perkel JM. Single-cell analysis enters the multiomics age. *Nature.* 2021;595:614–6.
33. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM 3rd, et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell.* 2019;177:1888–902, e21.
34. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 2017;18:83.
35. Hao Y, Hao S, Andersen NE, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184:3573–87.
36. Cao J, Spielmann M, Qiu X, Huang X, Ibrahim DM, Hill AJ, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature.* 2019;566:496–502.
37. Pliner HA, Packer JS, McFaline-Figueroa JL, Cusanovich DA, Daza RM, Aghamirzaie D, et al. Cicero Predicts cis-Regulatory DNA Interactions from Single-Cell Chromatin Accessibility Data. *Mol Cell.* 2018;71:858–71, e8.