

11262

17
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ACTIVIDAD DE LA SULFATASA ESTEROIDEA E
HIBRIDACION *IN SITU* DEL GEN STS PARA LA
IDENTIFICACION DE PORTADORAS EN LOS CASOS
ESPORADICOS DE ILX.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :
LA MEDICO ESPECIALISTA
MARGARITA VALDEZ FLORES



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274258



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ACTIVIDAD DE LA SULFATASA ESTEROIDEA E
HIBRIDACIÓN *IN SITU* DEL GEN STS PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE PORTADORAS EN LOS CASOS
ESPORÁDICOS DE ILX.**

ALUMNA: Margarita Valdés Flores
ASESORES: Dr. Sergio A. Cuevas Covarrubias
Dra. Susana Kofman Epstein

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS
Servicio de Genética, Hospital General de México, SSa.
Facultad de Medicina, UNAM.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
U.N.A.M.
Presente

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OFICIO/FMED/DEPI/0417/98

ASUNTO: Propuesta Oficial de Jurado.

At'n: Lic. Antonio Díaz García.

Informo a usted que el (la) C. Margarita Valdés Flores
aspirante al grado de Maestra en Ciencias Médicas
con la tesis titulada "Actividad de la sulfatasa esteroidea e hibridación
in situ del gen STS para la identificación de portadoras en los casos
esporádicos de ILX"

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Dr. Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado constituido por los siguientes sinodales:

PRESIDENTE:	Dr. Juan C. Díaz Zagoya
SECRETARIO:	Dr. Fabio Salamanca Gómez
PRIMER VOCAL:	Dr. Sergio A. Cuevas Covarrubias (Tutor)
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Susana Kofman Alfaro
TERCER VOCAL:	
SUPLENTE:	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
SUPLENTE:	

En cumplimiento con los Artículos 18 y 19 del Capítulo I, Título II, del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de noviembre de 1998.

JEFE DE LA DIVISIÓN.

Vo. Bo.

DR. HUGO ARECHIGA U.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
DIRECTOR

INDICE

Resumen	2
Abstract	3
Antecedentes	4
Justificación	12
Planteamiento del problema	12
Objetivo	12
Hipótesis	12
Material y métodos	13
Procedimientos	15
Resultados	19
Discusión	23
Conclusiones	28
Bibliografía	29

RESUMEN

Introducción. La ictiosis ligada al X (ILX) es una dermatosis caracterizada clínicamente por escamas oscuras, adherentes y regulares en piel. Inicia al nacimiento o en el primer año de vida y tiene una frecuencia de 1:2,000-6,000 varones. Algunos pacientes presentan criptorquidia y algunas portadoras retardo en la labor de parto y en ocasiones ambos presentan opacidades corneales. La ILX es debida a la deficiencia de la enzima sulfatasa de esteroides (SE), enzima microsomal que hidroliza los sulfatos de 3-beta-hidroxiesteroides. La deficiencia de la SE se ha asociado al incremento de sulfato de colesterol en el estrato córneo, lo que parece ser la causa del retardo en el proceso normal de descamación de la piel. La actividad de la SE puede ser determinada en leucocitos y otras líneas celulares para establecer el diagnóstico de pacientes y portadoras de ILX. El gen de la SE (gen STS) se localiza en Xp22.3. La mayoría de los pacientes con ILX (85-90%) presentan pérdida total del gen STS, mientras sólo 3 deleciones intragénicas y 8 mutaciones puntuales han sido reportadas. Análisis bioquímicos muestran que la mayoría de los casos aislados corresponden a casos heredados y no a mutaciones *de novo*. Del mismo modo, se informó de un caso en el cual la madre era portadora cuando inicialmente se había considerado al paciente como una mutación *de novo*. **Objetivo.** Analizar mediante hibridación *in situ* una muestra de casos aislados de ILX, para conocer cuántos corresponden a mutaciones nuevas. **Material y Métodos.** Los pacientes se clasificaron mediante el ensayo de la SE realizado en leucocitos con el sulfato de 7-[³-H]-dehidroepiandrosterona como sustrato y mediante PCR amplificando los extremos 5'-3' del gen STS. Las portadoras de ILX fueron analizadas con el ensayo de la SE y mediante FISH en linfocitos utilizando la sonda específica del gen STS, además de una sonda centromérica del X como control interno. **Resultados y Discusión.** Nueve de las 12 madres tuvieron una actividad de la SE compatible con el estado de portadora y mostraron una copia del gen STS mediante FISH, indicando que presentaban el defecto génico inicial. Sin embargo, una de las madres con actividad enzimática normal, reveló por FISH una sola copia del gen STS, lo que indicaba que se trataba también de una portadora de ILX. Estos resultados corroboran que la mayoría de los casos esporádicos de ILX no corresponden a mutaciones *de novo* y que el análisis mediante FISH debe realizarse en las madres de los casos esporádicos cuando presenten una actividad normal de la SE para descartar el estado de portadora de ILX.

ABSTRACT

Introduction. X-linked ichthyosis (XLI) is a disease characterized by dark, adhesive, and regular scales of skin. It is present at birth or early after birth with a frequency of 1:2,000-6,000 males. Cryptorchidism in patients, delayed labor in carriers and corneal opacities in both ones are features frequently associated. XLI is due to the steroid sulfatase (STS) deficiency, this enzyme hydrolyzes 3-beta-hydroxysteroid sulfates. The STS enzyme deficiency is associated with the increase of cholesterol sulfate in the stratum corneum and it seems to be the cause of the delay in the normal process of skin desquamation. The activity of STS enzyme can be determined in leukocytes and other cell lines to establish the correct diagnosis and to discard possible carriers of XLI. The STS gene locus is located on Xp22.3. Previous reports indicate a complete deletion of STS gene in 85-90% of XLI patients, while a few point mutations or intragenic deletions have been informed. In a previous report, biochemical analysis showed that most sporadic cases corresponded to inherited cases instead of *de novo* mutations. Similarly, in another report it was demonstrated the XLI carrier state in the mother of a patient initially classified as a *de novo* mutation. **Objective.** To corroborate by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) if most sporadic cases with XLI corresponded or not to *de novo* mutations. **Material and Methods.** To classify XLI patients, STS assay was performed in leukocytes using 7-[³H]-dehydroepiandrosterone sulfate as a substrate and 5'-3' ends of the STS gene were amplified through polymerase chain reaction (PCR). XLI carriers were also identified through STS assay. FISH analysis in carriers was done in lymphocytes using the STS gene probe and one internal control of the X-centromeric region. **Results and Discussion.** Nine out of 12 mothers presented an STS activity compatible with XLI-carrier state. These mothers also had only one copy of the STS gene indicating that they initially presented the STS gene defect. Nevertheless, another mother had normal STS activity but she harbored one copy of the STS gene in the FISH analysis. This result showed that she also corresponded to an XLI carrier. This data corroborated that most sporadic cases of XLI do not represent *de novo* mutations and that FISH must be included in the analysis of mothers of sporadic cases when they present normal STS activity to correctly discard the XLI carrier state.

ANTECEDENTES

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación y/o retención del estrato córneo, lo que condiciona descamación anormal de la piel. El término ictiosis ha sido empleado por más de 2000 años y proviene de la raíz griega "ichthys" que significa pez. Los hindúes y chinos se referían a la enfermedad como una afección con piel de serpiente o escamas de pescado y Alibert consideraba que era causada por vivir en áreas cercanas a corrientes de agua, mar o por ingerir pescado en estado de putrefacción. En 1884 Fox informó el caso del "niño cocodrilo" atribuyendo su causa al ataque de un cocodrilo sufrido por la madre durante la gestación (1-4).

La primera descripción de ictiosis documentada en la literatura médica se encuentra en la obra "On cutaneous diseases" por Robert William en 1908. Actualmente, con base en criterios clínicos, bioquímicos, moleculares y forma de herencia son 5 las variedades de ictiosis que se encuentran bien definidas, éstas son: ictiosis vulgar (IV), ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (ILX), ictiosis lamelar, eritrodermia ictiosiforme congénita e ictiosis bular (5-7).

Una de las variedades de ictiosis más importantes por su frecuencia es la ILX. Esta entidad se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X y es causada por la deficiencia en la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides (SE). La ILX se ha observado en diferentes grupos étnicos y afecta a 1 de cada 2,000-6,000 recién nacidos vivos del sexo masculino. Inicia generalmente durante los primeros meses de vida y los datos clínicos más importantes son la presencia de escamas oscuras, regulares, adherentes y de distribución generalizada. Sin embargo, predominan en cara anterior de abdomen, cuello y zonas de flexión, respetando generalmente palmas de las manos y plantas de los pies. En algunos pacientes se han observado opacidades corneales, criptorquidia y hernia inguinal. Por otra parte, se ha informado que las portadoras de esta enfermedad presentan algunas veces sangrado transvaginal y retardo en la labor de parto (8-15).

Algunos de los cambios histológicos observados en esta enfermedad incluyen; hipertrofia e infiltrado perivascular además de cambios inespecíficos en la zona granular de la epidermis (16).

La literatura internacional incluyendo los informes de pacientes mexicanos, señalan que la mayoría de los pacientes con ILX (90%), presentan pérdida total del gen de la SE (gen STS) como causa de la enfermedad. En 3 casos han presentado deleciones intragénicas que abarcan los exones II-V, VII-X y X y en 8 pacientes se ha informado de mutaciones puntuales. Es importante señalar que 5% de los pacientes presentan pérdida del gen STS y otros genes adyacentes, lo que condiciona la presencia de fenotipos más complejos que incluyen además de ILX, síndrome de Kallman, retardo mental y condrodysplasia punctata (17-24).

GEN STS

La actividad de la enzima SE se asocia a un gen único en humanos (gen STS) y los hallazgos que así lo sugieren son los siguientes: la transfección de plásmidos con cDNA del gen STS confiere todas las actividades de la enzima a las células receptoras y los pacientes con pérdida del gen STS carecen de las diferentes actividades de la enzima (25, 26).

El gen STS se extiende sobre una región de 146 kb en la región Xp22.3, muy cerca de la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones de tamaño variable y dos regiones que no se transcriben, una en el extremo 5' de por lo menos 206 pares de bases y otra en el extremo 3' de 668 pares de bases. Tiene además, una señal de poliadenilación (AATAAA) de 13 pares de bases antes del comienzo de la cola de poli-A. Existen datos que indican que la región promotora del gen STS es pobre en secuencias GC y aparentemente carece de sitios de unión a factores de transcripción conocidos. Sin embargo, se ha identificado una región de aproximadamente 1.3 kb en el extremo 5' que contiene varios sitios de unión potencial

para factores de transcripción, entre éstos se encuentran 3 elementos potenciadores (URE1-3) y un elemento represor (URE4). Por otra parte, se han identificado tres transcritos primarios en distintas líneas celulares, cada uno con pesos moleculares diferentes (2.7, 5.2 y 7.2 Kb) que parecen ser consecuencia de la adición de colas de poli-A de longitud variable y no del procesamiento alternativo del producto génico primario. Sin embargo, no se ha definido aún la función de cada uno de estos transcritos (27-30).

El gen STS tiene su homólogo no funcional (pseudogén) en los brazos largos del cromosoma Y (Yp11.2). La homología entre el gen funcional y el pseudogén es de 90% aproximadamente y las diferencias entre ambos están dadas por sustituciones de algunos pares de bases, pequeñas adiciones y deleciones que condicionan la incapacidad del pseudogén para originar algún producto proteico funcional (31).

Recientemente, se localizaron en la región Xp22.3 los genes que codifican para las arilsulfatasas D, E y F, todos ellos con una organización genómica muy similar, incluyendo al gen de la arilsulfatasa C. Por otra parte, trabajos recientes muestran que la localización de estos genes es idéntica en el cromosoma X de diferentes especies de primates, mientras que la copia homóloga, presente en el cromosoma Y, es distinta en cada una de estas especies. Es posible que este agrupamiento génico de arilsulfatasas en Xp22.3 tenga su origen a partir de eventos de duplicación génica, ocurridos ancestralmente en la región pseudoautosómica. Este parecería ser un cambio reciente en el genoma de mamíferos (32-34).

Existen familias de secuencias repetidas en número bajo de copias (G1.3 y CRI-S232) que se encuentran intercaladas y distribuidas en la región Xp22.3 y hacia ambos lados del gen STS. La presencia de estas secuencias en esta región condiciona posiblemente un apareamiento anormal durante la meiosis por la recombinación homóloga entre estas unidades de repetición, lo que podría explicar la alta frecuencia de las deleciones intersticiales en esta región génica (34-37).

El gen STS escapa al proceso de inactivación del cromosoma X, expresándose así en ambos cromosomas X en las mujeres normales. Sin embargo, la expresión de este gen es siempre menor en el cromosoma X inactivo, debido posiblemente a la presencia de genes contiguos inactivos. De esta manera, la actividad de la enzima SE en varones y mujeres no refleja el número de copias del cromosoma X presente en ambos sexos, ya que los niveles enzimáticos no guardan la esperada relación de 2:1, siendo la proporción encontrada de 1.3 -1.7:1 dependiendo de la línea celular. Únicamente en cabello se ha reportado una relación de 1:1 y en leucocitos de prepúberes de 2:1 (27, 38-41).

Finalmente, una gran parte de la literatura internacional señala que la mayor proporción de casos de ILX corresponde a mutaciones nuevas, sin embargo, estudios bioquímicos recientes en población mexicana muestran que la mayoría de los casos aislados de ILX (por análisis familiar) corresponden realmente a defectos heredados por la madre, ya que ésta muestra actividad de la enzima SE compatible con estado de portadora (menos de 25 pmol/mg proteína/hora) (18, 23,).

ENZIMA SULFATASA DE ESTEROIDES

La SE o arilsulfatasa C es una de las 6 arilsulfatasas presentes en los tejidos humanos (A, B, C, D, E y F) (tabla 1); se encuentra unida a la membrana microsomal y cataliza la separación hidrolítica del grupo sulfato de los 3-beta-hidroxiesteroides sulfatados (i.e. sulfatos de colesterol, estrona, testosterona, pregnenolona y dehidroepiandrosterona). Aparentemente, los esteroides en su forma sulfatada son biológicamente inactivos y tienen una vida media más larga en comparación al esteroide libre correspondiente. Esto podría sugerir que los esteroides sulfatados son reservorio de precursores para la producción potencial de hormonas biológicamente activas. Es conveniente mencionar que la acción de la SE es importante para la desulfatación de varios precursores de hormonas esteroideas, sobre todo de la dehidroepiandrosterona, proceso vital para el transporte de hormonas esteroideas a los compartimentos maternos, placentarios y fetales (42-47).

La SE se localiza en el retículo endoplásmico rugoso, cisterna de Golgi, retículo trans-Golgi, membrana plasmática y vía endocítica. Tiene una distribución ubicua y se ha detectado en vagina, endometrio, ovario, hipertrofia prostática benigna y células cancerosas de mama. Su pH óptimo oscila entre 6.5-7.5, su K_m es de $0.8\mu M$ para el sulfato de estrona, de $1.7\mu M$ para el sulfato de dehidroepiandrosteona y de $0.6\mu M$ para el sulfato de testosterona (47-49).

La SE comprende dos isoformas clasificadas por su movilidad electroforética en "s" o lenta (slow-migrating) y "f" o rápida (fast-migrating), sin embargo, únicamente la forma "s" corresponde a la SE. Estas isoformas están codificadas por genes diferentes, localizados en los brazos cortos del cromosomas X y no son resultado del procesamiento alternativo del producto génico primario. La expresión de estas variantes electroforéticas es tejido específica. La forma "s" es muy abundante en placenta, corazón, músculo esquelético, tiroides y glándula suprarrenal y la forma "f" se encuentra presente en hígado, páncreas, riñón y tiene solamente el 2-7% de la actividad de la SE. Es importante señalar que ambas isoformas muestran diferente especificidad a substrato, labilidad al calor, estructura proteica, pH óptimo y propiedades antigénicas (50).

La SE está compuesta por 583 aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la enzima madura. Este proceso dura aproximadamente dos días, siendo la vida media de la SE 4 días. La enzima activa está formada por múltiples subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 63 kDa, siendo el agregado activo más pequeño un dímero de 126 kDa. La SE tiene las características de una glicoproteína integrada a membrana y presenta cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, sin embargo, sólo dos son utilizados. Es estable a las alteraciones de pH, calor y exposición a urea y muestra las características de una proteína integrada a membrana. El modelo propuesto para la topología de la enzima incluye la presencia de tres dominios. Los extremos amino y carboxilo terminal se localizan en la porción luminal de la membrana, ambos contienen una cadena de oligosacáridos y se comunican por medio de un dominio hidrofóbico que comprende dos secuencias que se extienden en direcciones opuestas de la membrana (42, 45, 47, 51).

Recientemente, se ha sugerido que la SE juega un papel importante en la embriogénesis del ratón, particularmente en los procesos relacionados con el desarrollo embrionario de algunas estructuras del SNC. Estudios mediante hibridación *in situ* han mostrado que existe semejanza entre los niveles y sitios de expresión de los mensajeros de las enzimas SE y P450c17, lo que sugiere que ambas enzimas co-participan en procesos funcionales similares. Algunos de los sitios con gran expresión de ambas enzimas son cerebro medio, tálamo y corteza cerebral, sobre todo al final del último trimestre gestacional. Estudios post-mortem en dos pacientes adultos no relacionados, de 44 y 63 años de edad respectivamente detectaron abundantes cantidades en la actividad de la SE en núcleo central y tálamo. Se ha propuesto que la conversión talámica de DHEAS a DHEA es uno de los mecanismos que participan en el control de los procesos del crecimiento axonal y de las fibras del tálamo durante la organización de la citoarquitectura de la neocorteza y se considera que la actividad de la SE es uno de los procesos que regulan la neurosecreción talámica. Al parecer el DHEAS participa en los procesos de memoria en ratas y seres humanos y diversas modificaciones químicas en la actividad de la SE *in vivo* se han asociado con cambios en la memoria de ratas adultas (52-56).

Los resultados de investigaciones de la actividad de la SE con relación al desarrollo esquelético muestran la presencia de grandes cantidades de RNAm de SE en tejido cartilaginoso durante el proceso de embriogénesis, esto coincide con la aparición de los centros de osificación. Es posible que la enzima participe también en los procesos de remodelación ósea. Finalmente, se ha sugerido que la reducción postmenopáusica en la actividad de las enzimas relacionadas con la producción ósea de estrógenos (v. gr. SE) guarda relación con los procesos fisiopatológicos relacionados con la osteoporosis (57).

LA ILX Y LA SULFATASA DE ESTEROIDES

France y Liggins en 1969 aportan la primera evidencia de alteraciones en la actividad de la enzima SE, al demostrar que la disminución en la síntesis de estrógenos en las mujeres

portadoras de la deficiencia placentaria se debía a la disminución en la actividad de esta enzima. En estas mujeres se encontraron además de los niveles bajos de estriol, retardo en la labor del parto. Posteriormente, el seguimiento de estas portadoras demostró la presencia de ILX en sus productos. No fue sino hasta 1978 cuando Shapiro y cols. encontraron deficiencia en la actividad de la SE en cultivos de fibroblastos de piel de pacientes con ILX, la cual se había encontrado previamente en tejido placentario de mujeres portadoras de la deficiencia de esta enzima (58-62).

La deficiencia de SE en la ILX condiciona la acumulación de sulfato de colesterol en suero, membrana de los eritrocitos y estratos córneo y granuloso de la piel. En condiciones normales, la relación colesterol:sulfato de colesterol en el estrato córneo es de 10:1; sin embargo, en los pacientes con ILX esta relación alcanza proporciones de 1:1. La actividad de la SE es mayor en los estratos córneo y granuloso, en contraste, los estratos inferiores presentan una actividad de la enzima muy baja. Esto explicaría la acumulación del SC en las capas superficiales de la piel de pacientes con ILX. Por otra parte, se ha sugerido que la regulación de la relación colesterol:sulfato de colesterol en el complejo estrato córneo-membrana puede ser crítico en el proceso de descamación normal de la piel (63). Los lípidos constituyen 6-10% del estrato córneo y ocupan preferentemente los espacios intercelulares. Diversos estudios han demostrado cambios graduales en la composición de los lípidos en los diferentes estratos epidérmicos. Los cambios reportados en la composición de lípidos en los pacientes con ILX, no se limitan a piel. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales transportan al sulfato de colesterol, muestran un aumento en su movilidad electroforética al compararlas con las LDL de pacientes con otros tipos de ictiosis o bien controles sanos. De esta manera, la electroforesis de lipoproteínas permite realizar también el diagnóstico de ILX. El contenido de ésteres de colesterol en las LDL disminuye en la ILX, mientras que las relaciones entre triacilgliceroles/colesterol y apoproteína B/colesterol se incrementan (64-66).

Por otro lado, la determinación de la actividad de la enzima SE en tejidos como uñas, piel, cabello, fibroblastos y leucocitos permite establecer el diagnóstico de ILX así como el estado de portadora de la enfermedad, ya que los valores de la enzima en estas mujeres

están por debajo de los controles masculinos y femeninos sanos. Esta determinación resulta de gran utilidad, ya que permite proporcionar un correcto asesoramiento genético (67-72).

Tabla 1. Características de las arilsulfatasas A, B, C,D, E y F.

Arilsulfatasas	Ubicación del gen	Substratos	Enfermedad relacionada
A	22q13	Sulfato de dermatán	Leucodistrofia metacromática
B	5q13	Sulfatos de dermatán y condroitín	Mucopolisacaridosis tipo IV
C	Xp22.3	Sulfatos de 3- β -OH-esteroides	Ictiosis recesiva ligada al X
D	Xp22.3	*	*
E	Xp22.3	*	Condrodisplasia punctata
F	Xp22.3	*	*

* se desconce

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, en nuestro servicio, las pruebas bioquímicas han establecido el diagnóstico de ILX en más de 100 pacientes y la condición de portadora en más de 120 mujeres. De esta manera, la identificación de casos de presentación esporádica y familiar se ha realizado bioquímicamente. Sin embargo, consideramos que la hibridación *in situ* permite identificar de manera más precisa si los casos de presentación esporádica corresponden realmente a mutaciones nuevas o bien a casos heredados.

Con base en los antecedentes presentados el planteamiento de nuestra pregunta de investigación es el siguiente:

Cuál es la proporción de casos familiares y mutaciones nuevas de ILX en una muestra de pacientes mexicanos que representan casos aislados de la enfermedad al analizarlos mediante hibridación *in situ*.

OBJETIVO

Conocer la proporción de casos familiares y mutaciones nuevas en una muestra de casos aislados de ILX mediante hibridación *in situ*.

HIPOTESIS

La mayoría de los casos de ILX de presentación aparentemente esporádica, no corresponden a mutaciones nuevas.

MATERIAL Y METODOS

1. Selección de los Sujetos de Estudio.

Criterios de inclusión

- a).- Pacientes masculinos de cualquier edad con diagnóstico de ILX y que representan casos aislados de la enfermedad.
- b).- Que acepten participar en el estudio.

Criterios de eliminación

- a).- Se eliminarán aquellos casos en quienes no sea posible realizar de manera total los procedimientos requeridos en este estudio.

VARIABLES DE ESTUDIO

Variable Independiente. Pacientes con diagnóstico bioquímico y molecular compatible con ILX y que representen casos aislados de la enfermedad.

Variable Dependiente. Casos de ILX de presentación realmente esporádica o familiar, identificados mediante análisis materno empleando la hibridación *in situ*.

Definición operativa de las variables de estudio

Variable Independiente

Pacientes con diagnóstico de ILX, establecido con parámetros bioquímicos y moleculares.

Parámetro bioquímico

- 1).- Ausencia de actividad de la enzima SE en leucocitos: Esta se evaluó mediante la hidrólisis del sulfato de dehidroepiandrosterona a dehidroepiandrosterona en leucocitos.

utilizando ^3H -DHEAS como sustrato y determinándola en cuentas por minuto (cpm) mediante espectrofotómetro de centelleo de líquidos.

Parámetro molecular

1).- Pérdida total del gen STS: Para este fin se amplificaron mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los extremos 3' y 5' del gen STS.

Variable dependiente

Casos esporádicos (mutaciones nuevas): En las preparaciones cromosómicas de las madres de los pacientes con ILX se observarán 2 copias del gen STS.

Casos familiares: En las preparaciones cromosómicas de las madres de los pacientes con ILX se visualizará solamente 1 copia del gen STS

2. Diseño del estudio

Prospectivo, descriptivo, transversal y analítico.

3. Cálculo del tamaño de muestra

Tomando en cuenta un valor α de 0.5, β de 2.0 y esperando una diferencia de al menos 70% en la distribución de la única variable de interés (casos de ILX esporádicos y familiares), en una sola población (pacientes con ILX) el número de sujetos requeridos en el estudio es de 7 sujetos.

4. Procedimientos

Se captaron pacientes masculinos de cualquier edad con datos clínicos sugestivos de ictiosis (presencia de escamas oscuras, adherentes y de distribución generalizada) y sin antecedentes familiares de la misma enfermedad en cuando menos tres generaciones. En todos los casos se informó a los pacientes y/o a sus padres de las características del estudio, se les invitó a participar de manera voluntaria y con carta de consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de este hospital. Se determinó la actividad enzimática de la SE en los pacientes y se amplificó mediante PCR los extremos 5' y 3' del gen STS. Al no encontrarse actividad enzimática ni amplificación de los extremos del gen se estableció el diagnóstico de ILX. Una vez confirmado el diagnóstico de ILX en los pacientes se determinó la actividad enzimática a cada una de las madres de los pacientes y se realizó además hibridación *in situ* con la sonda específica del gen STS en preparaciones cromosómicas previamente obtenidas de estas posibles portadoras. Finalmente, se analizaron los resultados.

1.- Determinación de la actividad de la enzima SE en leucocitos (73, 74).

- a).- Toma de muestra sanguínea.- Se realizó a los sujetos de estudio con previo ayuno de por lo menos 8 horas. Se tomaron 10 ml de sangre venosa periférica de una de las venas antecubitales con jeringa de plástico estéril, empleando EDTA como anticoagulante.
- b).- Obtención de leucocitos.- Para este fin, la muestra sanguínea obtenida (10 ml) se centrifugó a 1400 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se separó el suero sanguíneo con los leucocitos y se añadieron 5-7 ml de NH_4Cl , se dejó reposar 3-5 minutos y posteriormente se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 5 minutos con el fin de obtener y lavar el botón de leucocitos. Este proceso se repitió por 3 ocasiones.
- c).- Ensayo de la actividad enzimática.- Para su realización se utilizó la población de leucocitos obtenida de la manera previamente descrita. La muestra fue resuspendida en 1 ml de amortiguador-tris 0.014M (pH 7.0), las células se fragmentaron empleando un politrón T-100 con vástago del número 10, a la velocidad máxima en dos ciclos, de 20 y 10 segundos, respectivamente. Al incubar la reacción se utilizó como sustrato al DHEAS- ^3H (10 μl , 33 nmol), para obtener como producto final a la DHEA- ^3H . La reacción fue en 200

μ l a 37° C, pH 7 por 1 hora. Con el propósito de detener la reacción y extraer el producto final (DHEA-³H) se agregó 1 ml de benceno frío (Merck, grado analítico), agitándose vigorosamente en vortex durante 2 minutos y centrifugándose 5 minutos a 2500 r.p.m. Posteriormente, de la fase superior (sobrenadante de benceno), fueron extraídos 600 μ l, a los cuales se les añadieron 5 ml de líquido de centelleo para posteriormente ser leídos por espectrofotometría de centelleo de líquidos. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado, contra controles masculinos y femeninos sanos, incluyéndose además un blanco. En los casos de pacientes con ILX no se detectó actividad enzimática.

2.- Amplificación mediante PCR de los extremos 3' y 5' del gen STS a los pacientes con ausencia de actividad de la enzima SE (75).

Para este fin se realizó extracción de DNA de la siguiente manera: Se emplearon 3 ml de sangre periférica de cada uno de los pacientes y se le agregó amortiguador de lisis de eritrocitos (tritón 1%, Tris 10mM y sacarosa 22 mM), se disolvió y centrifugó hasta obtener un botón de leucocitos libre de eritrocitos. Después, el botón de leucocitos se resuspendió en 570 μ l de NaCl 5 mM, se agregó SDS al 10% agitándose durante 10 minutos, se agregó NaCl saturado agitándose por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm a 4° durante 15 minutos. Finalmente, el DNA obtenido en el sobrenadante se precipitó en etanol frío, se lavó y se disolvió en agua.

Posteriormente, los extremos 3' y 5' del gen STS se amplificaron bajo las siguientes condiciones: kit para amplificación por PCR de Perkin Elmer, San Francisco, CA, se corrieron 30 ciclos cada uno con las siguientes características:

- 1.- Tiempo de extensión 1 minuto a 94°C
- 2.- Tiempo de alineación 30 seg a 60°C
- 3.- Tiempo de extensión final 2 minutos 72°C

La secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación de los exones fue la siguiente:

Exón 1

F-5' GGC CTA GAA GAA GGT TGA AGG TCC

R-5' AAG AGG TTG GAT GAG ATG GGC ATA

Exón 10

F-5' GAA ATC CTC AAA GTC ATG CAG GAA G

R-5' CCT CCA GTT GAG TAG CTG TTG AGC T

3.- Identificación de portadoras de ILX (69).

Una vez establecido el diagnóstico bioquímico y molecular de ILX en los pacientes se practicó el ensayo enzimático a las madres de los pacientes con el método anteriormente descrito con el fin de identificar bioquímicamente a las posibles portadoras de esta enfermedad, (en ellas la actividad de la SE no excedió los 0.21 pmol/mg/proteína/hora).

4.- Realización de estudio citogenético en cultivo de linfocitos de sangre periférica a las madres de los pacientes con ILX (76).

Para este fin se emplearon 2 ml de sangre venosa periférica obtenida de una de las venas del pliegue antecubital con una jeringa previamente heparinizada (10 UI de heparina por cada ml de sangre). Se adicionó 1 ml de sangre a un frasco con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (con glutamina), suplementado con 0.5 ml de suero de ternera fetal y antibióticos (Penicilina 2,000 U/ml y estreptomycin 275 mg/ml) además de 0.1 ml de fitoghemaglutinina. La preparación se incubó a 37°C durante 70 horas. Posteriormente se agregó 0.5 ml de colchicina al 0.02% y se incubó nuevamente durante 1 hora. Después el contenido de los frascos se transfirió a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se agregaron 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) y se incubó nuevamente a 37°C durante 30 minutos. Se centrifugó nuevamente el contenido de los tubos a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregaron 4-6 ml de fijador (metanol / ácido acético 3:1), gota a gota. Las preparaciones se sometieron a 2-3 lavados con el mismo fijador de la manera ya descrita. Finalmente, se prepararon laminillas (goteando con pipeta Pasteur en portaobjetos limpios y secando al aire libre).

5.- Hibridación "in situ" con la sonda específica del gen STS en leucocitos de sangre periférica de las madres de los pacientes con diagnóstico de ILX (77,78).

a).-Pretratamiento de las muestras

Las laminillas seleccionadas fueron tratadas con la siguiente solución; 70% de formamida/2X SSC pH 7-8 durante 5 minutos a una temperatura de 73 °C. Posteriormente, se deshidrataron en series de etanol (70%, 85% y 100%), durante 1 minuto.

b).- Preparación de la sonda

Para este fin se adquirió de manera comercial la sonda del cDNA del gen STS (VYSIS). Se mezclaron 1µl de la prueba, 2 µl de agua purificada y 7 µl de buffer de hibridación. Desnaturalizándose la sonda a 73°C durante 5 minutos.

c).- Hibridación

Se aplicaron 10µl de la reacción anterior por cada 25X25 mm de área en las preparaciones cromosómicas. Posteriormente, se cubrió con cubreobjetos y se selló con cemento de Rubber. Las preparaciones se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 24 h.

d).- Tratamiento post-hibridación

Las preparaciones se sometieron a tres lavados consecutivos de 10 minutos cada uno en solución de 50% formamida/2X SSC a 46°C, seguido después de un lavado en solución de 2X SSC durante 10 minutos a 46°C. Después, se sometieron a un lavado de 5 minutos en una solución de 2X SSC/ 1% NP-40 a 46°C. Finalmente, se procedió a la detección.

e).- Detección de la señal

A cada una de las preparaciones previamente tratadas se aplicaron 20µl de DAPI-II. Se cubrieron las laminillas con cubreobjetos y se analizaron las preparaciones en microscopio de epi-fluorescencia.

NOTA: La sonda empleada en el procedimiento incluye como control una prueba pericentromérica del cromosoma X (Xp11.1)

La sonda del gen STS proporciona un espectro naranja y la prueba control un espectro verde.

RESULTADOS

La muestra de sujetos de estudio incluyó 12 pacientes mexicanos con diagnóstico bioquímico y molecular compatible con ILX. Todos, con ausencia completa de la actividad de la enzima SE, al compararla con controles masculinos y femeninos sanos. En ninguno de los casos se detectó amplificación de los extremos 3' y 5' del gen STS mediante PCR, lo que permitió corroborar el diagnóstico de ILX. El ensayo bioquímico en 9 de las 12 madres estudiadas mostró actividad compatible con estado de portadora (≤ 0.21 pmol/mg/proteína/h) (casos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12). Cada uno de los ensayos en estas mujeres se realizó en dos ocasiones distintas, por duplicado y contra controles masculinos y femeninos sanos. Esto permitió clasificar inicialmente por medios bioquímicos a las portadoras de ILX. En la tabla 2 se muestran los resultados de los ensayos bioquímicos realizados a los pacientes, sus madres así como a los controles masculinos y femeninos incluidos en cada procedimiento. Por otra parte, los estudios citogenéticos realizados a las madres de los pacientes con el fin de obtener preparaciones para la hibridación *in situ* no mostró en ninguno de los casos alteraciones numéricas ni estructurales aparentes. La hibridación *in situ* presentó que el 100% de las mujeres con actividad enzimática compatible con estado de portadora presentaron solamente una copia del gen STS y de las tres mujeres con actividad enzimática normal solamente 2 mostraron dos copias del gen STS, la otra portadora (# 7) reveló una copia del gen. Los resultados se muestran con detalle en la tabla 3 y la figura número 1 muestra algunas fotografías de núcleos en interfase y en preparaciones cromosómicas de la portadora de ILX con actividad enzimática normal y una copia del gen STS (portadora # 7).

Tabla 2. Actividad de la enzima SE en pacientes con ILX y sus madres

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SE

# DE PACIENTE	PACIENTES CON ILX	PORTADORA (AMBOS ENSAYOS)	CONTROL MASCULINO	CONTROL FEMENINO
ILX1	0.00	0.20/0.18	0.64	0.86
ILX2	0.00	0.18/0.21	0.55	0.96
ILX4	0.00	0.21/0.17	0.79	1.02
ILX5	0.00	0.21/0.20	0.76	0.98
ILX6	0.00	0.19/0.17	0.58	0.88
ILX8	0.00	0.21/0.18	0.69	0.91
ILX9	0.00	0.18/0.21	0.73	0.94
ILX10	0.00	0.17/0.19	0.58	0.89
ILX12	0.00	0.18/0.21	0.75	0.92

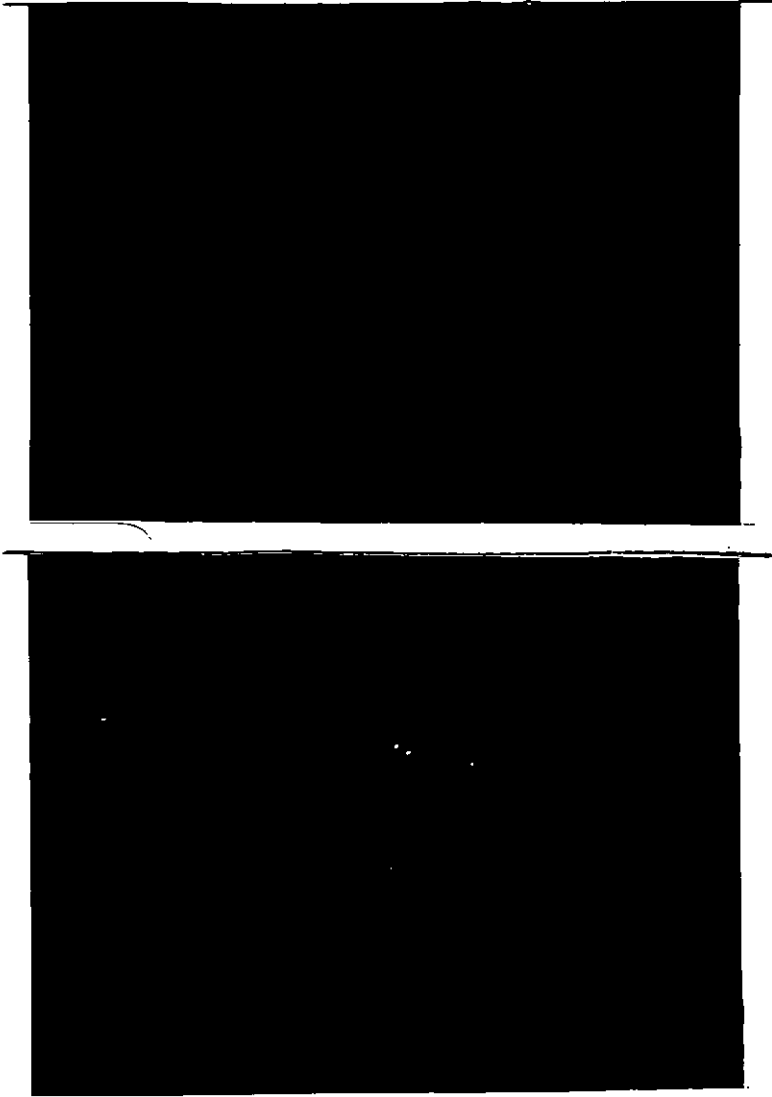
Los valores de la enzima se expresan en pmol/mg/proteína/h.

Los casos sombreados corresponden a las mujeres con actividad enzimática normal.

Tabla 3. Resultados de la hibridación *in situ* realizada a las madres de los pacientes con ILX.

Madre de paciente con ILX	Nº Células Analizadas	Número de copias del gen STS
MXL1	12	1
MXL2	10	1
MXL3	8	2
MXL4	10	1
MXL5	11	1
MXL6	6	1
MXL6	10	1
MXL8	8	1
MXL9	10	1
MXL10	10	1
MXL11	10	2
MXL12	10	1

La región sombreada corresponde a una portadora identificada por FISH que mostró una actividad enzimática normal de la SE.



FISH en metafase y núcleos en interfase en la portadora de ILX con actividad enzimática normal. Las dos señales en verde que hibridan en ambos cromosomas X corresponden a sondas centroméricas del X utilizadas como control interno. La señal naranja que corresponde a la sonda del gen STS se observa sólo en un cromosoma X.

DISCUSIÓN

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación y/o retención del estrato córneo de la piel y clínicamente se distinguen por la presencia de descamación anormal de la misma. Las variedades de ictiosis genéticamente bien definidas son ictiosis vulgar (IV), ictiosis recesiva ligada al X (ILX), ictiosis lamelar, eritrodermia ictiosiforme congénita e ictiosis bular, siendo la IV y la ILX las más importantes por su frecuencia. Esta clasificación está basada en parámetros clínicos, bioquímicos, moleculares y forma de herencia (1,6,7).

En México no existen informes de la frecuencia real de este grupo de enfermedades. Sin embargo, estudios en otras poblaciones sugieren que la variedad más común corresponde a la IV, la cual tiene una forma de herencia autosómica dominante y una frecuencia aproximada de 1:250 recién nacidos vivos (9,10). No obstante, informes bioquímicos de nuestro grupo de investigación parecen indicar que en nuestro país existe un predominio importante de la ILX sobre la IV (23).

En el presente trabajo se estudiaron 12 pacientes mexicanos con diagnóstico de ILX confirmado bioquímicamente y de presentación aparentemente esporádica. En ninguno de los casos se documentaron antecedentes familiares de ILX en al menos tres generaciones. El diagnóstico de pacientes con ILX se estableció cuando la actividad de la enzima SE en leucocitos estuvo ausente y no amplificaron los extremos 5' y 3' del gen STS mediante PCR. El ensayo enzimático de la SE se realizó en las madres de los pacientes con el fin de identificar bioquímicamente a las posibles portadoras de ILX.

Se ha considerado que los casos no familiares de ILX corresponden en su principalmente a mutaciones de novo. Sin embargo, en nuestro estudio la actividad enzimática de la SE en la mayoría de las madres de los pacientes con ILX de presentación aparentemente esporádica, mostró valores compatibles con el estado de portadora. Estos resultados observados en las madres sugieren que la mayoría de los casos corresponden realmente a defectos heredados

y no a mutaciones nuevas. Esto difiere totalmente a lo informado en la literatura mundial (17,18).

El análisis bioquímico de las familiares de los pacientes (abuela y tías maternas) parece indicar que el defecto génico inicial ocurrió en la madre. El análisis de ligamiento en los abuelos maternos del paciente podría indicarnos si la delección del gen ocurrió en la madre o en el padre. Aún cuando los reportes previos informan que la mayoría de las delecciones ocurren por intercambio anómalo dentro del mismo cromosoma X, esto no descartaría el apareamiento X-Y de la región pseudoautosómica como condicionante de la ruptura y pérdida del gen STS. Además, debe tomarse en consideración la presencia de familias de secuencias repetidas en número bajo de copias que se encuentran intercaladas y distribuidas hacia ambos extremos del gen STS en esta región (Xp22.3) y que pueden favorecer un apareamiento génico anormal, condicionando así, delecciones intersticiales en esta región (35-37).

En 9 de los casos (MXL 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12) las mujeres presentaron una actividad ≤ 0.21 pmol/mg proteína/hora lo que bioquímicamente representa el estado de portadora de la enfermedad. En el resto de las mujeres (MXL 3, 7 y 11) la actividad de la enzima se mostró en rangos normales, es decir con valores similares a los controles sanos. Este análisis bioquímico sugiere que, aparentemente 75% del total de los casos estudiados son realmente de presentación familiar y el resto (25 %) corresponden a casos de presentación esporádica (mutaciones nuevas). Esto reafirma los hallazgos previos observados en nuestro laboratorio y representan datos muy interesantes, ya que son opuestos a lo documentado en la literatura internacional, en la cual se considera a las mutaciones nuevas como las más comunes en los casos aislados de ILX. Con el propósito de confirmar lo anterior se realizó hibridación *in situ* con la sonda específica del cDNA del gen STS en las preparaciones cromosómicas previamente obtenidas de las 12 posibles portadoras (madres de los pacientes).

Los resultados de la hibridación *in situ* revelaron que las 9 mujeres con actividad bioquímica de la SE, compatible con estado de portadora, tuvieron solamente una copia del

gen STS (MXL 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 10 y 12), lo que corroboró que se trataba de casos heredados de la madre y no de presentación esporádica como lo sugería el análisis genealógico. Sin embargo, la portadora número 7 (MXL7) tuvo una actividad de la SE dentro de rangos normales, pero al realizar la hibridación *in situ* se observó solamente una copia del gen STS, indicando que también se trataba de una portadora de ILX. Estos resultados indican la presencia de falsos negativos observados en el ensayo bioquímico para la identificación de portadora. Es decir, aunque la actividad de la SE se muestre en rangos normales, puede tratarse de una portadora de ILX. De este modo, si el análisis bioquímico inicial de las portadoras mostró que en 75% de los casos de ILX el defecto primario provenía de la madre (casos familiares), los resultados de la hibridación *in situ* demostraron que realmente la proporción de casos familiares es de 83 %, mayor a lo obtenido mediante el análisis bioquímico inicial. Esto nos indica que algunas veces la determinación bioquímica no identifica correctamente la condición de portadora. Sin embargo, se confirma el hecho de que la mayoría de los casos esporádicos realmente corresponden a casos heredados.

Aunque la determinación de la actividad de la SE en leucocitos ha mostrado ser en general un buen procedimiento para la detección de pacientes y portadoras de ILX, la especificidad del ensayo bioquímico se ve limitada para establecer en un 100% la condición de portadora de ILX. Con base en los hallazgos anteriores, resulta conveniente la realización de estudios moleculares complementarios, tal como la hibridación *in situ*, con el objeto de identificar de manera más precisa a las portadoras de ILX y de proporcionar el asesoramiento genético que realmente corresponde a cada uno de los casos.

Con base en todo lo anterior y considerando el uso en México y en otros lugares del ensayo bioquímico de la SE en leucocitos, como procedimiento para la detección de pacientes y portadoras de ILX, es importante evaluarlo correctamente como procedimiento diagnóstico. En este caso se requerirá el cálculo del tamaño de muestra requerido para el estudio, así como el planteamiento de intervalos de confianza y la comparación del ensayo contra un estándar ideal de comparación (estándar de oro) con el fin de establecer

adecuadamente la sensibilidad, especificidad y valores predictivos reales del procedimiento.

A pesar de que el presente trabajo incluyó el análisis bioquímico y molecular de 12 portadoras de ILX, nuestro grupo ha analizado bioquímicamente a más de 100 posibles portadoras de ILX en los últimos 4 años y resalta el hecho de los valores enzimáticos tan bajos que presentan constantemente estas mujeres (96%). Es posible que estos valores sean el resultado de un patrón de inactivación al azar del cromosoma X, debido a que la actividad del gen STS es siempre menor en el cromosoma X inactivo, posiblemente por la presencia de genes contiguos inactivos. Si tomamos en cuenta que aleatoriamente la única copia del gen STS que presentan las portadoras de ILX se encuentra en la mitad de los casos en el cromosoma X activo y en la otra mitad en el inactivo, únicamente tendríamos 50% de cromosomas X activos expresando el gen STS, lo que se traduciría en los valores enzimáticos tan bajos observados en la mujeres portadoras de ILX.

Por otra parte, si 10% de las mujeres en general presentan un patrón de inactivación preferencial del cromosoma X, aún sin daño génico (80), es posible que en algunas portadoras se observe un patrón de inactivación similar. Esto condicionaría que si la inactivación ocurre en el cromosoma X que presenta el gen STS alterado, la actividad enzimática alcanzaría valores normales o similares a los controles sanos. En estos casos, la determinación enzimática no representaría el mejor método para la identificación de portadoras. En estas pacientes resultaría indispensable realizar la hibridación *in situ* para descartar el estado de portadora, considerado que la causa más frecuente de ILX a nivel molecular es la pérdida total del gen incluyendo regiones adyacentes. En aquellos casos en que la ILX no se debe a la pérdida total del gen, la técnica de FISH tampoco sería adecuada. Además, un porcentaje elevado de pacientes representan casos esporádicos, lo que nos indica la necesidad de la hibridación *in situ* como método alternativo en caso de que la determinación enzimática no permita descartar el estado de portadora. Sin embargo, la limitación de esta prueba se establece en la especificidad y no en la sensibilidad, lo que nos permite asegurar que las portadoras diagnosticadas mediante este procedimiento bioquímico son realmente portadoras a diferencia del 10% de las madres de hijos con ILX

que son clasificadas incorrectamente como no portadoras de la enfermedad. Aunque lo anterior tiene un fundamento experimental y teórico es solamente una hipótesis, que debe probarse en trabajos posteriores y con un mayor número de pacientes.

Finalmente, en la ILX como en todas las enfermedades de origen genético, el diagnóstico correcto y la identificación de las portadoras de entidades recesivas ligadas al cromosoma X son requisitos fundamentales para proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

CONCLUSIONES

1.- En el presente trabajo se identificó mediante el ensayo bioquímico que 75% (9) de las madres de los pacientes presentaban actividad de la SE compatible con el estado de portadora. Lo que sugería que presentaban el defecto génico inicial, indicando que la mayor proporción de casos analizados corresponden a casos familiares y no a mutaciones nuevas.

2.- El análisis molecular de las posibles portadoras por FISH mostró que todas las mujeres con actividad enzimática compatible con el estado de portadora mostraban solamente una copia del gen STS. Sin embargo, una de las tres mujeres con actividad enzimática normal se observó mediante el FISH una sola copia del gen STS, lo que indicaba que también se trataba de una portadora de ILX. Los resultados moleculares indican que la proporción de casos heredados en esta muestra de pacientes es de 83% y no del 75% como lo sugería el estudio bioquímico inicial.

3.- A pesar de que el ensayo bioquímico ha resultado un buen método para la identificación de pacientes y portadoras de ILX, es necesario validarlo como procedimiento diagnóstico, sobre todo en aquellas mujeres que muestran actividad enzimática normal, ya que es posible que en algunos de estos casos se trate de portadoras de ILX.

4.- La identificación precisa de casos familiares y mutaciones nuevas es requisito fundamental para proporcionar el asesoramiento genético que realmente corresponde a cada caso.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

- 1.- Ghadially R, Chong LP. Ichthyosis and hyperkeratotic disorders. *Dermatol Clin* 1992;10: 597.
- 2.- Greither A. *Dermatologica (basel)* 1964; 128: 464.
- 3.- Touraine A. *Ann Derm Syph (Paris)* 1958; 85: 257.
- 4.- Wells RS, Kerr CB. *Arch Derm* 1965; 92: 1.
- 5.- Willan R. *On cutaneous diseases*. Johnson, London 1808.
- 6.- Frost P. Ichthyosiform dermatoses. *J Invest Dermat* 1973; 60: 541.
- 7.- Shayder Ott F. All about ichthyosis. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38: 835.
- 8.- Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *Br Med J* 1966; 1: 947.
- 9.- Kerr CB, Wells RS. Sex linked ichthyoses. *Ann Hum Genet* 1965; 29: 33.
- 10.- Okano M, Kitano Y, Yoshikawa K, Nakamura T, Matsuzawa Y, Yuasa T. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris: Comparison of their clinical features based on biochemical analysis. *Br J Dermatol* 1988; 119: 777.
- 11.- Andria A, Ballabio G, Parenti S, DiMaio, Piccirillo A. Steroid sulphatase deficiency and hypogonadism. *Eur J Pediatr* 1984; 142: 304.
- 12.- Sever RJ, Frost P, Weinstein G. Eye changes in ichthyosis. *JAMA* 1968; 6: 2283.
- 13.- Cuevas-Covarrubias S, Kofman S, Rivera M, Beirana A, Diaz JC. Inguinal hernia in recessive X-linked ichthyosis. *J Dermatol* 1994; 21: 985.
- 14.- Schnyder W. Inherited ichthyoses. *Arch Derm* 1970; 102: 240.
- 15.- Shapiro LI and Weiss R. X linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency. *Lancet* 1978; 4: 70.
- 16.- Wells RS, Kerr CB: The histology of ichtyosis. *J Invest Dermat* 1966; 46: 530.
- 17.- Bonifas JM, Morley BJ, Oakey RE, Waikon Y, Epstein EH. Cloning of cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X-chromosome-linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9248.

- 18.- Shapiro LJ, Yen P, Pomerantz D, Martin E, Rolewic L, Mohandas T. Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8477.
- 19.- Basler E, Grompe M, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutations in the steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 483.
- 20.- Martin ES, Yen P, Shapiro LJ: A splice junction mutation in a patient with X-linked ichthyosis and steroid sulfatase deficiency. *Am J Hum Genet* 1990; 47: A228.
- 21.- Alperin ES, Shapiro LJ. Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 20756.
- 22.- Morita E, Katoh O, Shinoda S, Hiragon T, Tanaka T, Kameyoshi Y, Yamamoto S. A novel point mutation in the steroid sulfatase gene in X-linked ichthyosis. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 244.
- 23.- Cuevas-Covarrubias S, Kofman S, Maya G, Diaz Zagoya JC, Orozco E. X-linked ichthyosis in Mexico: high frequency of deletions in the steroid sulfatase encoding gene. *Am J Med Genet* 1997; 72: 415.
- 24.- Maya G, Cuevas-Covarrubias S, Zenteno JC, Ulloa A, Kofman S and Méndez JP. Contiguous gene syndrome due to deletion of the first three exons of the KAL gene and complete deletion of the STS gene. *Clin Endocrinol* 1998, 48: 713.
- 25.- Horwitz AL. Genetic complementation studies of multiple sulfatase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 6496.
- 26.- Ballabio A and Shapiro LJ. Steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. 7th Ed. Vol 11. Charles Scriver editor McGraw-Hill Inc 1995; p 2999.
- 27.- Mohandas T, Shapiro LJ, Sparkes RS, Sparkes MC: Regional assignment of the steroid sulfatase-X-linked ichthyosis locus: Implications for a non-inactivated region on the short arm of human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5779.
- 28.- Muller C, Walhstrom J, Rogers H. Further evidence for assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp. *Hum Genet* 1981; 58: 446.
- 29.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell* 1987; 49: 443.

- 30.- Li XM, Alperin ES, Salido E, Gong Y, Yen P, Shapiro LJ. Characterization of the promoter region of human steroid sulfatase: a gene which escapes X inactivation. *Somat Cell Mol Genet* 1996; 22 (2): 105.
- 31.- Fraser N, Ballabio A, Zollo M, Persico MG, Craig I. Identification of incomplete sequences steroid sulphatase on the human Y chromosome: evidence for an ancestral pseudoautosomal gene?. *Development* 1987; 101: 127.
- 32.- Parenti G, Meroni G, Ballabio A. The sulfatase gene family. *Curr Opin Gen Develop* 1997; 7: 386.
- 33.- Meroni G, Franco B, Archidiacono N. Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggest gene duplications in an ancestral pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 1996; 5(4): 423.
- 34.- Puca AA, Zollo M, Repetto M. Identification by shotgun sequencing, genomic organization and functional analysis of a fourth arylsulfatase gene (ARSF) from the Xp22.3 region. *Genomics* 1997; 42: 192.
- 35.- Li X-M, Yen PH, Shapiro LJ. Characterization of a low copy repetitive element S232 involved in the generation of frequent deletions of the distal short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acid Res* 1992; 20: 1117.
- 36.- Yen PH, Li X-M, Tsai S-P, Jhonson C, Mohandas T, Shapiro LJ. Frequent deletions of the human X-chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell* 1990; 61: 603.
- 37.- Ballabio A, Bardoni B, Guiolo S, Basler E, Camerino G. Two families of low copy-number repeats are interspersed on Xp22.3: Implications for the high frequency of deletions in this region. *Genomics* 1990; 8: 263.
- 38.- Migeon B, Shapiro LJ, Norum RA, Mohandas T, Axelman J and Debora R. Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome. *Nature* 1982; 299: 838.
- 39.- Crocker M, Craig I. Variation in regulation of steroid sulphatase locus in mammals. *Nature* 1983; 303: 721.
- 40.- Muller CR, Migl B, Traupe H, Ropers HH, Haple R: X-linked steroid sulfatase: evidence for different gene dosage in males and females. *Hum Genet* 1980; 57: 197.
- 41.- Miranda-Duarte A, Valdés-Flores M, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya J.C, Kofman-Alfaro S and Cuevas-Covarrubias SA. Steroid sulfatase activity in leukocytes: a comparative study in 45, X0; 46, X, i(Xq) and carriers of sulfatase deficiency. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47 (1): 137.

- 42.- Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63: 1127.
- 43.- Dibbelt L, Kuss E. Human placental sterylsulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hopfeler's* 1991; 372: 173.
- 44.- French AP, Warren JC: Properties of steroid sulfatase and arylsulphatase activities of human placenta. *Biochem J* 1969; 105: 410.
- 45.- Dominguez OV, Valencia SA, Loza AC: On the role of steroid sulfatase in hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem* 1977; 8: 491.
- 46.- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 1997; 5: 277.
- 47.- Conary J, Nauwerth A, Burns G, Hasilik A, Figura K. Steroid sulfatase. *Eur J Biochem* 1986; 158: 71.
- 48.- Vaccaro AM, Salviolo R, Muscillo M, Renola L: Purification and properties of arylsulphatase C from human placenta. *Enzyme* 1987; 7: 115.
- 49.- Munroe DG, Chang PL. Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 102.
- 50.- Chang PL, Mueller OT, Lafrenie RM, Varey PA, Rosa EN, Davidson RG, Henry WM, Shows TB. The human arylsulfatase-C isoenzymes: two distinct genes that escape from X inactivation. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 729.
- 51.- Stein C, Hille A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem* 1989; 264 (23): 13865.
- 52.- Compagnone NA, Salido E, Shapiro L and Mellon S. Expression of steroid sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology* 1997; 138: 4768.
- 53.- Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JLR and Mellon SH. Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* 1995; 136: 512.
- 54.- Compagnone NA and Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: a potential signaling molecule for neurocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.
- 55.- Li PK, Rhodes ME, Burke AM and Johnson DA. Memory enhancement mediated

- by the steroid sulfatase inhibitor (p-O-sulfamoyl)-N tetradecanoyl tyramine. *Life Sci* 1997; 60: 145.
- 56.- Flood JF, Smith GE and Roberts E. Dehydroepiandrosterone and its sulfate enhance memory retention in mice. *Brain Res* 1988; 447: 269.
- 57.- Purohit A, Flanagan AM, Reed MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992; 131: 2027.
- 58.- France JT, Liggins GC. Placental sulfatase deficiency. *J Clin Endocr* 1969; 29: 138.
- 59.- France JL, Seddon RJ, Liggins GC: A study of a pregnancy with low estrogen production due to placental sulfatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36:1.
- 60.- Lykkesfeldt G, Nielsen MD, Lykkesfeldt A. Placental steroid sulfatase deficiency, biochemical diagnosis and clinical review. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 49.
- 61.- Jobis AC, De Groot WP, Tigges AJ, De Bruijn HW, Rijken Y, Meijer AEFH and Marinkovic-Ilsen A. X-linked ichthyosis and X-linked placental sulfatase deficiency; a disease entity. *Histochemical observations. Am J Path.* 1980; 99: 279.
- 62.- Shapiro LJ, Roberta W, Buxman M, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. *Lancet* 1978; 7: 756.
- 63.- Epstein EH, Krauss RM, Shackleton CH. X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein. *Science* 1981; 214: 659.
- 64.- Williams MI, Elias PM. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. *J Clin Invest* 1981; 65: 1404.
- 65.- Elias PM, Williams ML, Maloney ME. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. *J Clin Invest* 1984; 74: 1414.
- 66.- Nakamura T, Matsuzawa Y, Okano M, Kitano Y, Funahashi T, Yamashita S, Tarui S. Characterization of low-density lipoproteins from patients with recessive X-linked ichthyosis. *Atherosclerosis* 1988; 70: 43.
- 67.- Matsumoto T, Sakura N, Ueda K. Steroid sulfatase activity in nails: screening for X-linked ichthyosis. *Pediatr Dermatol* 1990; 4: 266.
- 68.- Baden HP, Hooker PA, Kubilus J, Tarascio A. Sulfatase activity of keratinizing tissues in X-linked ichthyosis. *Pediatr Res* 1980; 14: 1347.
- 69.- Cuevas-Covarrubias S, Kofman-Alfaro S, Orozco E, Diaz-Zagoya JC. The

- biochemical identification of carrier state in mothers of sporadic cases of X-linked recessive ichthyosis. *Genet Counsel* 1995; 6: 103.
- 70.- Epstein EH, Leventhal ME. Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermis and diagnosis of recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest* 1981; 67: 1257.
 - 71.- Cuevas-Covarrubias S, Kofman S, Beirana A, Díaz JC. Accuracy of the clinical diagnosis of recessive X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris. *J Dermatol* 1996; 23: 594.
 - 72.- Cuevas-Covarrubias S.A, Valdés Flores M, Orozco-Orozco E, Díaz-Zagoya JC and Kofman-Alfaro S. Most "sporadic" cases of X-linked ichthyosis are not de novo mutations. *Acta Derm Venereol.* 1999; 79: 143.
 - 73.- Burstein S and Dorfman R. Determination of mammalian steroid sulfatase with 7- α -3-H-beta-hydroxy,androstan-en-17-ona sulfate. *J Biol Chem* 1963; 238: 1656.
 - 74.- Cuevas-Covarrubias S A, Juárez-Oropeza M A, Miranda-Zamora R. El ensayo enzimático de la sulfatasa esteroidea en la ictiosis ligada al X. *Rev Fac Med UNAM*, 1992; 35 (1): 3.
 - 75.- Ballabio A, Ranier JE, Chamberlain JS, Zollo M, Caskey CT. Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. *Hum Genet* 1990; 84: 571.
 - 76.- Verma IIS, Babu A. *Human Chromosomes: principles and techniques*. 2nd ed Mc Graw Hill, Inc, 1994.
 - 77.- Mitchell BS, Dhami D and Schumscher V. *In situ* hybridization: a review of methodologies and applications in the biomedical sciences. *Med Lab Sci* 1992; 49: 107.
 - 78.- Wilkinson DG 1993. *The theory and practice of in situ hybridization. A practical Approach*. Wilkinson DG. IRL press Oxford University, New York, pp 1.
 - 79.- Maestrini E, Rivella S, Tribiolo C, Rocch M, Camerino G, Santachiara S, Parolin O, Notarangelo LD, Toniolo. Inactivation of novel RFLPs vicinity of CpG islands in Xq28: Application to the analysis of the pattern of X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 156.