

26.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IDENTIFICACION DE PORTADORAS DE ICTIOSIS
LIGADA AL CROMOSOMA X, MEDIANTE
HIBRIDACION *IN SITU*

290838

T E S I S

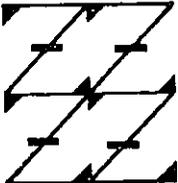
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LIC. EN QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUZ MARIA GONZALEZ HUERTA

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D. F.

ABRIL DEL 2001



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.

INDICE

	Página
Resumen	1
I.- Marco Teórico	3
Características de la piel normal	4
Ictiosis recesiva ligada a X y SE	6
Inactivación del cromosoma X	9
Gen STS	10
Hibridación <i>in situ</i>	12
II.- Planteamiento y Justificación del problema	15
III.- Objetivo	16
IV.- Hipótesis	16
V.- Metodología	17
VI.- Material y reactivos	20
VII.- Procedimiento	23
VIII.- Resultados	28
IX.- Discusión de resultados	33
X.- Conclusiones y recomendaciones	38
XI.- Anexó	39
XII.- Referencias	40

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN
EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
DE LA UNIDAD DE GENÉTICA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D

ASESORADO POR:
M. EN C. MARGARITA VALDÉS F.
DR. EN C. SERGIO A. CUEVAS C.

2001

AGRADECIMIENTOS.

A mi Directora y Asesor de tesis M. en C Margarita Valdés y Dr. en C. Sergio A. Cuevas, por las enseñanzas, apoyo y confianza brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Susana Kofman, jefa del departamento de Genética del HGM, por permitirme la realización del trabajo experimental en el laboratorio de Biología Molecular y brindarme la oportunidad de continuar mi desarrollo profesional.

A la Q.F.B Ana Luisa Jimenéz por su tiempo, dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo.

A los Químicos: Javier Parada, Lourdes Vega, Martha Sánchez y Carlos Salvador, por los conocimientos aportados durante mi formación profesional.

A T.L.C Artemio Flores por sus criticas y comentarios siempre atinados.

Al Q.F.B Antonino Saenz Prieto, por las aportaciones profesionales y personales que permanecerán presentes en mí, por siempre, en memoria de su recuerdo.

A quienes de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

*Como un testimonio hoy y siempre
quiero expresar mi agradecimiento a
quienes con amor me han apoyado
y guiado para lograr una meta más en
mi vida, con admiración
y cariño*

*A mis padres:
Marino González y Ma. de la Luz Huerta*

*A mis hermanas:
Norma Celia y Maricela.*

*Así mismo agradezco a mis
verdaderos amigos
con quienes he compartido
innumerables momentos
y que forman una fuente
de apoyo y superación en
especial a:
Mary, Manuel, Lydia, Angeles
Rosaura, Alicia y Raúl.*

JURADO.

PRESIDENTE: Q.F.B FCO. JAVIER PARADA GARCÍA.

VOCAL: M. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES.

SECRETARIO: M. EN C. RAQUEL RETANA UGALDE.

SUPLENTE: DR. EN C. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS.

SUPLENTE: Q.F.B MA. DE LOURDES VEGA NAVARRETE.

RESUMEN.

La ictiosis ligada al cromosoma X (ILX) es una genodermatosis que presenta una frecuencia de 1:2000-6000 varones recién nacidos vivos. Se caracteriza clínicamente por presentar escamas oscuras, regulares, generalizadas y adherentes en la piel, manifestándose en el nacimiento o en el primer año de vida. Se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X y es debida a la deficiencia de la enzima sulfatasa de esteroides (SE) la cual es codificada por el gen STS. La mutación más común en la ILX es la delección total del gen (85-90%), el resto corresponden a mutaciones puntuales o delecciones parciales.

La identificación de varones y portadoras de ILX en el Servicio de Genética del HGM se ha llevado a cabo mediante el análisis bioquímico de la SE y la amplificación de los extremos 5' y 3' del gen STS. Sin embargo, existe evidencia de que alrededor del 15% de las heterocigotas para el gen STS, no son clasificadas correctamente mediante el análisis bioquímico de la actividad enzimática de la SE. Por esta razón, el presente trabajo se encaminó a la realización de un método complementario como la hibridación *in situ* con fluorescencia para identificar certeramente la condición de portadora de ILX empleando una sonda con la secuencia complementaria del gen STS. Como control interno, la hibridación se realizó utilizando simultáneamente una sonda centromérica del X marcada con un fluorocromo diferente.

El trabajo incluyó el análisis de 14 portadoras obligadas de ILX (identificadas previamente por genealogía) cuyo defecto fue la pérdida total del gen STS. En todas se realizó el ensayo bioquímico y solamente en 12 de ellas se obtuvieron resultados compatibles con estado de portadora. Estas portadoras al ser analizadas por FISH mostraron una copia del gen, lo que confirmaba su condición de portadoras. A pesar de ser portadoras obligadas, en los 2 casos restantes la

actividad bioquímica resultó ser similar a la observada en los controles sanos mientras que en el análisis mediante FISH de estas mujeres, se observó una sola copia del gen STS. Estos resultados indican que el análisis por FISH debe realizarse en mujeres con actividad enzimática normal y en casos de apariencia esporádica con la finalidad de confirmar o descartar la condición de portadora y proporcionar el asesoramiento genético correspondiente en cada caso. Cabe mencionar que la hibridación *in situ* es útil sólo en los casos de pérdida total del gen STS, ya que no permite la clasificación de portadoras en el caso de mutaciones puntuales o deleciones parciales.

I.- MARCO TEÓRICO.

Las Ictiosis.

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación y/o retención del estrato córneo de la piel, lo que condiciona descamación anormal de la misma (1,2).

El término ictiosis ha sido empleado por más de 2000 años y proviene de la raíz griega "IXOYE" que significa pez. Los hindúes y chinos se referían a la enfermedad como una afección en la piel de serpiente o escamas de pescado, 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. La primera descripción de ictiosis documentada en la literatura médica se encuentra en la obra "On cutaneous diseases" por Robert William en 1908. En 1933 Cokaine fue el primero en usar la clasificación genética siendo reclasificada por Greither en 1964, así como por Taurine en 1958 y Wells y Kerr en 1965 (3,4).

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. Siendo la IV y la ILX las más frecuentes, (cuadro 1). Existen además otras condiciones ictiosiformes genéticamente indefinidas (5,6).

Cuadro 1: Características clínicas de las ictiosis.

Tipo de ictiosis	Forma de herencia	Características de las escamas	Defecto bioquímico
Vulgar	AD	Finas, irregulares y adherentes.	Desconocidos
Ligada al cromosoma X	LX	Grandes, oscuras, regulares y adherentes	Deficiencia de SE. ↑SC y LDL
Lamelar	AD AR	Grandes, gruesas, bordes elevados	Esterol libre y ceramida.
Bulosa	AD	Gruesas, verrucosas y oscuras.	Desconocido
Eritroderma ictiosiforme	AR	Finas.	Desconocido.

AD: Autosómica dominante, AR: Autosómica recesiva, LX: ligada al cromosoma X. SE: Sulfatasa de Esteroides, SC: Sulfato de colesterol, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, ↑ incremento.

Fuente: Modificación de Shwayder y Ott.

Características de la piel normal.

La piel forma la superficie externa continua del organismo. Se le reconocen cuatro funciones principales: protección, termorregulación, sensibilidad y metabólica (7).

La piel varía en grosor, color, cantidad de pelo y glándulas dependiendo de la región del organismo. Conserva una estructura básica conformada por dos capas: la epidermis (origen ectodérmico) que es la capa externa con epitelio plano

estratificado queratinizado y la dermis (origen mesodérmico), de tejido conectivo denso, fibro-elástico, altamente vascularizado y que presenta numerosos receptores. La dermis se une a los tejidos subyacentes por la hipodermis o tejido subcutáneo que contiene tejido adiposo (8,9).

Histológicamente la epidermis se caracteriza por presentar 5 capas (fig. 1) o estratos, las que consideradas desde el límite dérmico son:

Estrato basal: Compuesto de una capa de células cilíndricas o cúbicas altas.

Estrato espinoso: Las células se hacen irregularmente poliédricas con un apilamiento horizontal moderado, presenta núcleos ovales, y puentes intercelulares debido a los cuales toma nombre de este estrato.

Estrato granuloso: Constituido por hileras de células aplanadas, rómbicas y citoplasma con numerosos gránulos llamados queratohialinos. Contiene una gran cantidad de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena larga.

Estrato lúcido: Contiene células aplanadas densamente agrupadas. Los núcleos celulares empiezan a degenerar en las células externas.

Estrato córneo: Se compone de numerosas capas de células cornificadas sin núcleos (células córneas). El citoplasma es ocupado por queratina, produciéndose un proceso de descamación continua. Este estrato es rico en lípidos. La epidermis en el ser humano se renueva cada 3 a 4 semanas.

Además de las células anteriores también se encuentran en la piel otros tipos celulares con diferente función tales como las células de Merkel (asociadas a terminaciones nerviosas), melanocitos (productores de melanina), células de Langerhans (sistema mononuclear fagocítico) (8-10).

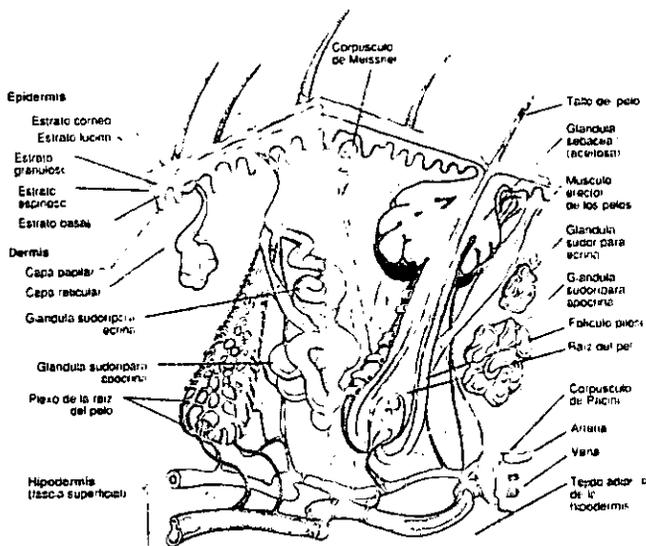


Fig. 1 Corte histológico de la piel.

Ictiosis recesiva ligada al cromosoma X y la SE.

En 1965 Kerr y cols. estudiando las manifestaciones clínicas y genealógicas, pudieron distinguir a la ILX como una enfermedad diferente a las otras ictiosis (1).

La ILX se ha observado en diferentes grupos étnicos y afecta a 1 de cada 2,000-6,000 varones. Sin embargo, en nuestro país no se conoce la prevalencia de esta entidad. 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, zonas de flexión y ambas extremidades. Respetan generalmente palmas de las manos y plantas de los pies (11-14).

France y Liggins en 1969 aportaron la primera evidencia de alteraciones en la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides (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 la enzima. En estas mujeres se encontraron niveles bajos de estriol y retardo en la labor de parto. Posteriormente, en el seguimiento de estas portadoras se demostró la presencia de ILX en sus productos.⁽⁷⁾ En 1978 Shapiro y col., encontraron en cultivos de fibroblastos de piel de pacientes con ILX, deficiencia en la actividad de la SE, misma que se había informado en mujeres con deficiencia placentaria de esta enzima ⁽¹⁵⁾.

La SE o arilsulfatasa C se encuentra unida a la membrana microsomal y cataliza la separación hidrolítica del grupo sulfato de los 3-β-hidroxiesteroides sulfatados (p. ej. sulfatos de colesterol, estrona, pregnenolona y dehidroepiandrosterona). En la ILX la deficiencia de SE 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, las porciones basales presentan una actividad de la enzima muy baja. Esto explicaría la acumulación del sulfato de colesterol en las capas superficiales de la piel de pacientes con ILX ^(16,17). Los cambios reportados en ILX con respecto a los lípidos no se limitan solamente a la piel, también se alteran las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales transportan al sulfato de colesterol. Las LDL muestran un aumento en su movilidad electroforética al compararlas con controles sanos y un incremento de la relación entre triglicéridos / colesterol ⁽¹⁸⁾.

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 además en células cancerosas de mama y en la hipertrofia

prostática benigna. Su pH óptimo oscila entre 6.5-7.5, su Km es de 0.8 μM para el sulfato de estrona, 1.7 μM para el sulfato de dehidroepiandrosterona y 0.6 μM para el sulfato de testosterona. Existen dos isoformas de la SE, la forma "s" o lenta (slow-migrating) y la "f" o rápida (fast-migrating), sin embargo, únicamente la forma "s" corresponde a la SE. La isoforma "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. La expresión de estas variantes electroforéticas es tejido específica. Es importante señalar que ambas isoformas muestran diferente especificidad al sustrato, labilidad al calor, estructura protéica, pH óptimo y propiedades antigénicas (19,25).

El polipéptido de la SE está compuesto por 583 aminoácidos, de los cuales los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la enzima madura. Este proceso dura dos días siendo la vida media de la SE de 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 (19,21).

La determinación de la actividad de la enzima SE en tejidos como uñas, piel, cabello, fibroblastos y leucocitos permite establecer el diagnóstico de ILX, además de que permite identificar la condición de portadora, ya que los valores de la enzima en estas mujeres está por debajo de los controles masculinos y femeninos sanos. Esta identificación precisa de portadoras es importante para proporcionar el asesoramiento genético correspondiente (26-30).

Inactivación del cromosoma X.

Los hechos fundamentales de la inactivación del X se establecieron poco después de postularse la hipótesis de Lyon, en 1961 en la cual sugirió que para mantener un equilibrio en la dosis génica entre las mujeres (XX) y varones (XY), uno de los 2 cromosomas X de la mujer debería inactivarse (31,32).

Se ha demostrado que durante las primeras etapas de la embriogénesis hasta el estadio de mórula ambos cromosomas X deben ser eucromáticos y estar activos para evitar el efecto de aneuploidía. Además, se ha reconocido que la inactivación del X ocurre en forma heterogénea. Sin embargo, el cromosoma X inactivo en las células germinales debe reactivarse antes del inicio de la meiosis ya que ambos cromosomas X deben estar activos para que ésta proceda normalmente (31).

Al parecer, en la región Xq13 del cromosoma X humano existe una región donde se inicia el proceso de inactivación que posteriormente se extiende a la mayor parte del cromosoma. Si bien el mecanismo de inactivación aún no ha sido completamente definido, el proceso se describe generalmente en tres estadios: iniciación del proceso de inactivación, que comienza en el centro de la inactivación, extensión de la inactivación de la mayoría de los genes de X y mantenimiento de la inactivación. La extensión de la señal de inactivación debe distinguir tanto al cromosoma que no se inactiva como a los locus de genes que escapan del proceso de inactivación (33).

Hallazgos recientes demuestran que existen genes en el cromosoma X que escapan al proceso de inactivación y casi todos tienen un gen homólogo no funcional en el cromosoma Y (34). Se considera que un gen escapa al proceso de inactivación si existe una expresión significativamente detectable en el cromosoma X inactivo,

aunque ésta no sea tan elevada como en el X activo, tal es el caso del gen que codifica para la enzima SE.

Entre los genes que escapan al proceso de inactivación se encuentran los genes STS, KAL, DXS1283E, MIC2, ZFX, entre otros (34).

Características generales del gen STS.

La SE está codificada por el gen STS ubicado en los brazos cortos del cromosoma X. El gen STS se extiende sobre una región de 146 kb en Xp22.3 muy cerca de la región pseudoautosómica (fig. 2). 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 (35-39).

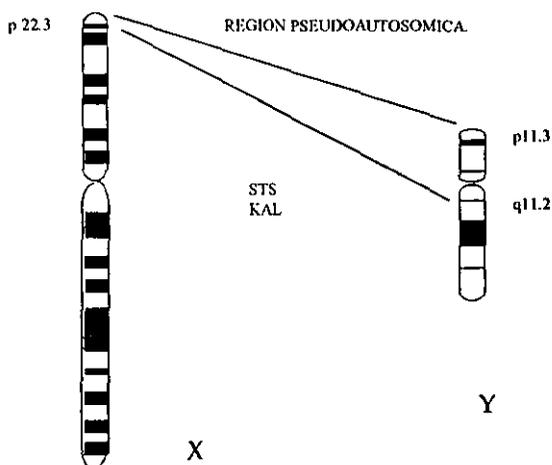


Fig 2.- Localización del gen STS en los cromosomas sexuales humanos.

La mayoría de los pacientes con ILX (90%), presentan pérdida total del gen STS como causa de la enfermedad, en el resto de los casos se han presentado deleciones intragénicas que abarcan los exones II-X, II-IV, I-V y 2 en el extremo 5', VIII-X y X y 9 casos con mutaciones puntuales. Es importante señalar que 5% de los pacientes además del gen STS pierden otros genes adyacentes, lo que condiciona la presencia de fenotipos más complejos que se conocen como síndrome de genes contiguos. Estos además de ILX pueden incluir, síndrome de Kallman, retardo mental y condrodíplasia punctata principalmente (40-48).

Por otra parte, estudios bioquímicos recientes en población mexicana muestran que la mayoría de los casos esporádicos de ILX corresponden en realidad a defectos heredados por la madre, ya que éstas muestran actividad de la enzima SE compatible con estado de portadora (de $\leq 0.20 + 0.06$ pmol / mg proteína / h). Este dato es diferente a lo informado en la literatura internacional, en la cual se

considera a las mutaciones de novo como las más frecuentes del mismo modo estudios internacionales han demostrado que en la población mexicana se observa una alta prevalencia de ILX, con respecto a IV (49,52).

Déterminación de la actividad enzimática de la SE.

A partir de los estudios realizados por Shapiro y cols. en 1978 acerca de la deficiencia de la SE en cultivo de fibroblastos de la piel en pacientes con ILX, la determinación de la actividad bioquímica de la SE se ha utilizado en diversas poblaciones celulares (i.e., leucocitos, amniocitos, y fibroblastos) con el fin de detectar pacientes y portadoras de ILX (16,28).

Un procedimiento alternativo para el diagnóstico de ILX es la determinación de la movilidad electroforética de lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la ILX el sulfato de colesterol se incrementa a niveles superiores y las LDL que son las encargadas de transportarlo, muestran un incremento en su movilidad electroforética. (18)

Hibridación *in situ* fluorescente

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite la detección de secuencias de ácidos nucleicos o proteínas. El análisis por hibridación con fluorescencia fue desarrollada en 1986 y se realizaba utilizando agentes radioactivos. En este método una secuencia conocida de DNA denominada sonda fue marcada con un radioisotopo, permitiendo la unión a su secuencia complementaria en las preparación cromosómicas o diversos tejidos. La señal pudo ser visualizada mediante autoradiografías de alta resolución (53-55).

El uso de sondas marcadas directamente con fluorocromos tiene la intención de visualizar directamente el sitio de hibridación de la sonda, evitando así la detección inmunocitoquímica como en el caso de la biotina y digoxigenina. En la actualidad se tiene la disponibilidad de fluorocromos, los cuales se pueden usar en la misma preparación, reduciendo así la posibilidad de pérdida de material en la manipulación de pasos continuos para la detección indirecta (tabla 2) (56-59).

Tabla 2: Fluorocromos, utilizados en técnicas de FISH.

Fluorocromo empleado	Excitación máx. nm	Emisión máx. nm	Color de la fluorescencia.
Cumarina (AMAC)	350	450	azul
Fluoresceína (FITC)	495	515	verde
Rojo texas	587	612	rojo
Rhodamina (TRITC)	559	588	naranja
DAPI*	355	450	azul
Quinacrina*	455	495	amarillo
Yoduro de propidio*	530	615	rojo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

TRITC: Tetrametil rodamina isotiocianato

DAPI: 4,6- diamino-2-fenil indol

PI: Yoduro de propidio.

* Tinción de secuencias de DNA

En el caso de la ILX, el ensayo bioquímico en leucocitos de la SE ha sido un método utilizado para la realización del diagnóstico de varones afectados y portadoras, sin embargo en la identificación de portadoras existe evidencia de que alrededor del 15% no son identificadas correctamente.⁽⁶³⁾ Por lo tanto es recomendable incluir pruebas complementarias como la hibridación *in situ* con

fluorescencia para la identificación de portadoras de ILX , siempre que el defecto genético sea la delección total del gen STS, ya que este método nos permitirá observar el número de copias del gen STS presentes en su genoma en células en interfase y en metáfase, obteniendo así resultados completos. Esto con la finalidad de que los afectados y familiares reciban un asesoramiento genético adecuado.

II.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el servicio de Genética del Hospital General de México la incidencia de la ILX es alrededor de 15 casos anuales y hasta la fecha, las pruebas bioquímicas han establecido el diagnóstico de ILX en más de 100 pacientes y se han identificado a más de 120 mujeres como portadoras. Sin embargo, existe evidencia de que el ensayo bioquímico no permite la identificación de alrededor del 15 % de heterocigotas (62). Por otra parte, el procesamiento de la muestra requiere de un control estricto de variables tales como la pureza, calidad del sustrato marcado y condiciones de reacción que son capaces de modificar los resultados obtenidos. Con base en los antecedentes presentados el planteamiento de nuestra pregunta de investigación es la siguiente: Representa la hibridación *in situ* un método complementario en la identificación correcta de portadoras de ictiosis ligada al cromosoma X, cuyo defecto molecular es debido a la delección total del gen STS.

III.- OBJETIVO GENERAL

Conocer si la hibridación *in situ* con fluorescencia representa un método complementario para la identificación de portadoras de ictiosis ligada al cromosoma X, cuando su defecto genético sea la deleción total.

IV.- HIPÓTESIS.

La hibridación *in situ* representa un método que puede utilizarse como prueba complementaria para la identificación de portadoras de ictiosis ligada al cromosoma X, cuando el defecto génico sea la deleción total del gen STS.

III.- OBJETIVO GENERAL

Conocer si la hibridación *in situ* con fluorescencia representa un método complementario para la identificación de portadoras de ictiosis ligada al cromosoma X, cuando su defecto genético sea la deleción total.

IV.- HIPÓTESIS.

La hibridación *in situ* representa un método que puede utilizarse como prueba complementaria para la identificación de portadoras de ictiosis ligada al cromosoma X, cuando el defecto génico sea la deleción total del gen STS.

V.- METODOLOGÍA.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Se trata de una investigación biomédica, prospectiva, descriptiva, transversal y analítica.

Criterios de inclusión

- a) Portadoras obligadas de ILX (identificadas por árbol genealógico)
- b) Que acepten participar en el estudio mediante carta de consentimiento informado.

Criterios de eliminación

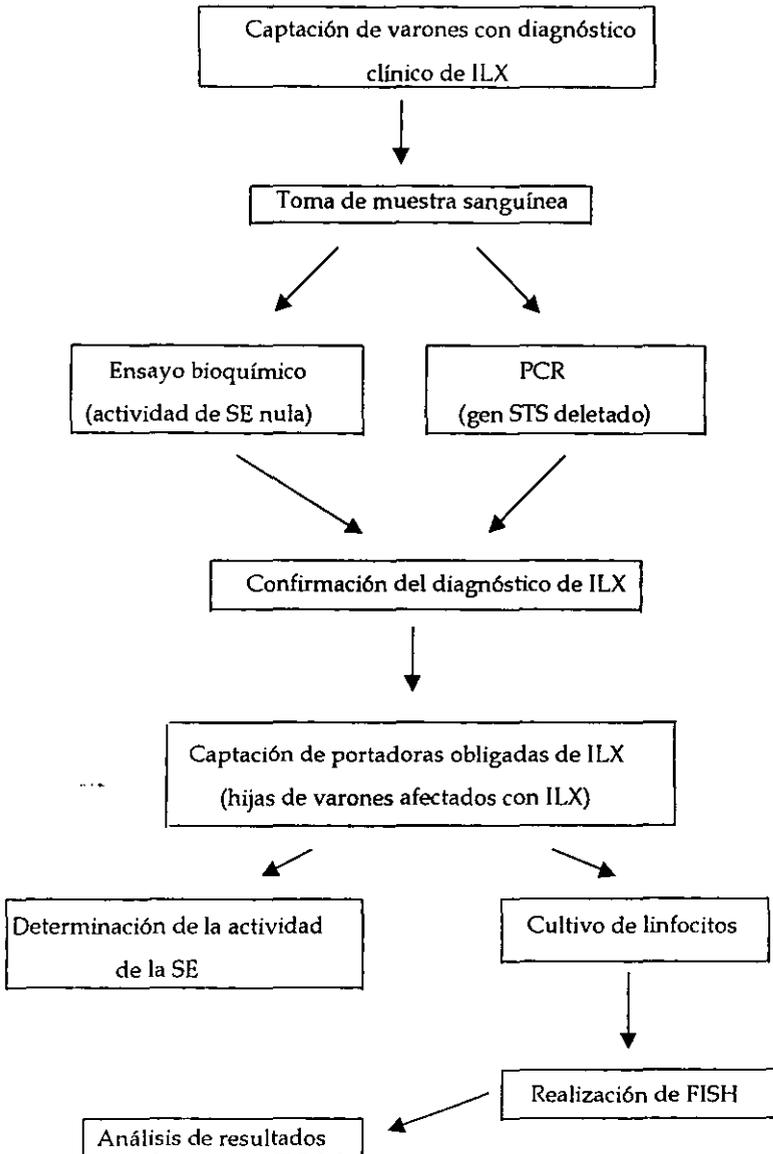
- a) Se eliminarán aquellos casos en quienes no sea posible realizar de manera total los procedimientos requeridos en este estudio.

Variable Independiente: Portadoras obligadas de ILX.

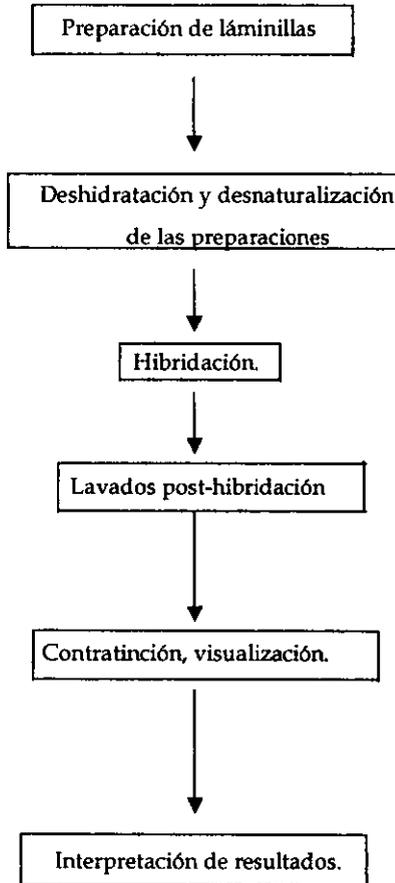
Variable Dependiente: Resultados obtenidos del análisis de FISH, (observando una sola copia del gen STS en las preparaciones cromosómicas), así como los valores de la actividad de la SE.

a).- DIAGRAMA DE FLUJO

Metodología general



b) Diagrama de flujo para el análisis por FISH



VI.-MATERIAL Y REACTIVOS.

INSTRUMENTOS

- Microscopio de epi-fluorescencia con un filtro de triple banda (ADR X-60)
- Espectrofotómetro de Centelleo de líquidos (COUNTER LS 6500, Beckman)
- Incubadora (BUEKELO)
- Baño María con agitación (MAXI-SHAKE)
- Balanza electrónica (CHYO MP 3000)
- Microcentrifuga (CENTRO MP4R)
- Politrón T-100 con vástago número. 10
- Cámara húmeda
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro (Beckman)
- Microcentrifuga refrigerada

CRISTALERIA

- Probetas volumétricas 100ml.
- Pipetas graduadas 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo 15X100 mm
- Termómetros
- Vasos de precipitado 25, 50 y 100 mL
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos con fondo cónico de 15 mL
- Viales de 15 mL con tapa de rosca
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Pipetas Pasteur
- Viales transparentes de 3 mL

- Embudos de tallo corto

MATERIALES DIVERSOS

- Gasas
- Gradillas
- Cintas adhesivas
- Mechero Fisher
- Micropipetas semiautomáticas 200-1000, 5-40, 20-200 0.05-2 μ l
- Multidispensador (Brinkmann)
- Guantes
- Algodón
- Tubos con tapa para centrifuga de 15 mL (LABCON)
- Jeringas de 10 mL
- Ligaduras
- Torundas
- Tubos eppendor de 25, 500 , 1500 y 2000 μ l

REACTIVOS.

- 7-DHEA-S marcado con H_3 .
- Sonda LSI del gen STS con control CEPX (Vysis)
- Buffer para hibridación
- Cemento Rubber
- Medios de cultivo para cariotipo (PB-MAX, GIBCO)
- Kit para PCR
- Oligonucleotidos, DNTP's
- Formamida
- Etanol 100% (MERCK grado analítico)
- Benceno (MERCK grado analítico)
- Ácido acético glacial (MERCK)

- Metanol (MERCK)
- Colorante Giemsa.
- Líquido de centellatlelo
- 4,6 Diamino-2-fenil indol
- Fitohemaglutinina.
- SOLUCIONES
- NH₄Cl 0.85%.
- TRIS pH 7.0 0.014M
- Colcemid 10 ug/mL
- KCl 0.075M
- Fijador 3:1 Metanol /ác. acético
- Solución 2X SSC
- Ác. Etilendiaminotetracético sal disódica EDTA
- Heparina
- Solución de Formamida al 70%
- Solución de Formamida al 50%.
- Solución de 2XSSC con NP-40
- Solución de Bradford

MUESTRA BIOLÓGICA

- Sangre venosa periférica suspendida en EDTA como anticoagulante (para ensayo bioquímico y extracción de DNA)
- Sangre venosa heparinizada (para obtener preparaciones cromosómicas)

VII.- PROCEDIMIENTO

Con el fin de corroborar el diagnóstico clínico de ILX en los varones seleccionados y después en las portadoras obligadas, se les realizó la determinación de la actividad de la enzima SE en leucocitos de la siguiente manera:

Toma de muestra sanguínea.- Se realizó a los sujetos de estudio con previo ayuno de por lo menos ocho horas. Se extrajeron 10 ml. de sangre venosa periférica de una de las venas antecubitales con jeringa de plástico estéril, empleando EDTA como anticoagulante.

- a) **Obtención de leucocitos.-** Para este fin, la muestra sanguínea obtenida (10 ml) se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min. Posteriormente, se separó el plasma sanguíneo al cual se le añadieron de 5-7 ml de cloruro de amonio (NH_4Cl 0.85%). La muestra se dejó reposar 3-5 min. y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 6 min, con el fin de lavar el botón de leucocitos obtenido. Este proceso de lavado se repitió por 3 ocasiones.
- b) **Ensayo de la Actividad Enzimática.-** Para su realización se utilizaron los leucocitos obtenidos de la manera previamente descrita. La muestra se resuspendió en 1 ml de amortiguador-tris 0.014M; se procedió a fragmentar las células empleando un Politrón T-100 con vástago del número 10, a la velocidad máxima en dos ciclos, de 20 y 10 segundos respectivamente. Posteriormente se incubó la reacción durante 1 hora utilizando como sustrato 10 μl de Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEAS-H_3), para un volumen de 200 μl de muestra, se homogeniza la enzima y el sustrato y se procedió a la incubación a 37° C durante 1 hora. Con el propósito de detener la reacción y extraer el producto final (DHEA) después del tiempo de incubación se agregó 1 mL. de Benceno frío (Merck, grado analítico), agitándose vigorosamente en vórtex durante 2 minutos y se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, del sobrenadante, se extrajeron 600 μl , a los cuales se les

añadieron 5ml de líquido de centelleo para posteriormente ser leídos por espectrofotometría de centelleo de líquidos.

Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado, en ocasiones diferentes y contra controles masculinos y femeninos sanos, incluyéndose además un blanco. En los casos de pacientes con ILX no se detectó actividad enzimática de la SE.

Análisis mediante PCR

Por medio del método salino se obtuvieron las muestras de DNA de los pacientes para posteriormente amplificar los extremos 5' y 3' con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la siguiente mezcla de reacción:

Agua deionizada, Buffer 1X dNTP's con una concentración de 0.6 mM de cada uno, 0.5 mM de cada praimer, MgCl₂ 3 mM, dos unidades de Taq polimerasa y la muestra de DNA problema. Trabajando con un volumen final de 25 µl. Las muestras se sometieron a 94°C por 5 min, 30 ciclos 94 °C, 68° C 2 min y 72 °C por 3 min, con la finalidad de amplificar los exones 1-10 del gen STS, usando el termociclador Perkin Elmer. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

La secuencia de los oligonucleotidos amplificados fue la siguiente:

Oligos del exón 1

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

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

Oligos del exón 10

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

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

Para cada corrimiento en gel de agarosa la muestra se procesó junto con dos controles, uno positivo el cual no contiene el gen y otro negativo en el cual el gen STS está presente.

Análisis de portadoras obligadas de ILX mediante FISH

Realización de estudio citogenético en cultivo de linfocitos de sangre periférica a las madres de los pacientes con ILX .

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 mililitro de sangre). Se adicionó 1 ml de sangre a un frasco con 5 ml de medio de cultivo PB-MAX Karyotyping Medium con l-Glutamina, suplementado con suero de ternera fetal, antibióticos (100U/ml de penicilina G, 100mcg/ml de sulfato de estreptomicina), además de 200 µl de fitohemaglutinina. La preparación se incubó a 37 °C durante 70.5 hrs. Posteriormente, se agregaron 0.5 ml de colchicina (10 µg/ml) y se incubó nuevamente durante 30 min. Después el contenido de los frascos se transfirió a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se le agregaron 12 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) precalentada a 37°C, nuevamente se incubó a 37°C durante 30-40 min. Terminado el tiempo de incubación se centrifugó el contenido de los tubos a 3000 r.p.m durante 5 min., se decantó el sobrenadante y se agregaron 4-6 ml de fijador (metanol/ácido acético 3:1), gota a gota. Las preparaciones fueron sometidas a lavados 2-3 veces, con el fijador de la misma manera antes descrita. Finalmente, se prepararon las laminillas (goteando con la pipeta Pasteur en portaobjetos limpios y secando al aire libre).

Hibridación "in situ" con Fluorescencia (FISH)

a) Para su realización se adquirió una sonda comercial de identificación específica del locus (LSI), en la cual se encuentra el gen STS (Xp22.3), esta sonda esta marcada con el espectro naranja e incluyó además un control interno (CPX) específico para la región centromérica del cromosoma X, el cual se encuentra marcado con un fluorocromo visible en el espectro verde.

1) Pre-tratamiento de las muestras:

Las laminillas seleccionadas se deshidrataron en series de etanol (70%, 80% y 95%) durante 2 minutos. Una vez secas, se desnaturalizaron por 5 min en solución de formamida 70%, inmediatamente se trasladaron a una jarra coplin con etanol al 70% ,85 y 100% en series de 1 min.

Las preparaciones deshidratadas en etanol al 100% se dejaron secar sobre una parilla de calentamiento a 45°C y se procedió a colocar la sonda.

2) Preparación de la sonda:

La sonda comercial de LSI se mezcló con la solución de hibridación en una proporción de 1:7, y ambas se colocaron en solución acuosa a un volumen final de 10 unidades.

3) Hibridación.

Se aplicaron 10 µl de la sonda por cada 25 x 25 mm de área en las preparaciones cromosómicas. Posteriormente, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con cemento de Rubber. Las preparaciones se incubaron a 37 °C en cámara húmeda, en oscuridad durante 24- 48 horas.

4) Tratamiento post-hibridación.

Se retiró el cubreobjetos de la preparación y se procedió a lavar, para eliminar el exceso de marca. Los lavados se realizaron a 46°C por series de 3-4 min. Utilizando primero solución de lavado con 50% de formamida, seguido de solución de 2XSSC con NP-40 y por último en 2XSSC. Se secaron las preparaciones a temperatura ambiente en oscuridad.

5) Detección de la señal:

A cada una de las preparaciones previamente tratadas se les aplicaron 10 µl de contratinción, en este caso DAPI-II, ya que se tiene la presencia de dos fluorocromos en distintos espectros en la misma preparación, se cubrió la preparación con un cubreobjetos, evitando así la formación de burbujas.

Finalmente, se analizaron las preparaciones en un microscopio de epi-fluorescencia. Una vez establecido el diagnóstico bioquímico y molecular de ILX en los varones afectados se realizó ensayo bioquímico de la SE e hibridación *in situ* con fluorescencia en las portadoras de ILX.

VIII.- RESULTADOS.

El estudio incluyó 5 sujetos varones mexicanos con diagnóstico clínico de ILX, a los cuales se les realizó análisis bioquímico y molecular. Se les determinó la actividad enzimática de la SE, la cual estuvo ausente (0.0 pmol/mg proteína / h) en todos los casos (tabla 1). Posteriormente, se procedió al análisis molecular de los casos con el fin de confirmar el diagnóstico bioquímico. Para este fin, se empleó la técnica de PCR, en la cual se amplificaron los extremos 5' y 3' del gen STS. En todos los casos se encontró la ausencia total del gen STS (figura 1). Estos datos confirmaron el diagnóstico de ILX en los pacientes.

Se llevó a cabo la captación de portadoras obligadas de ILX, las cuales se seleccionaron a través de análisis genealógico fig. 2 (considerando portadoras obligadas a las hijas mujeres de varones con diagnóstico confirmado de ILX). Estas mujeres fueron analizadas bioquímicamente mediante la determinación de la actividad de la SE e hibridación *in situ* con fluorescencia.

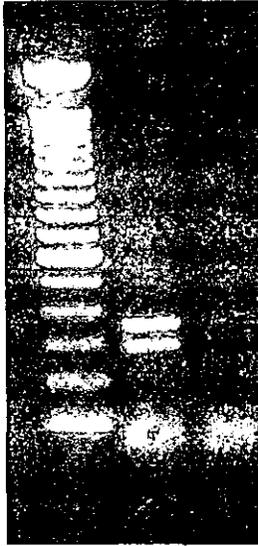
De las 14 portadoras obligadas que se analizaron, 12 (P-1,2,3,5,6,7,8,9,10,12,13 y 14) mostraron una actividad de la SE compatibles con estado de portadora (0.19-0.26 pmol/mg proteína h). Los 2 casos restantes (4 y 11) mostraron actividad enzimática con valores dentro de los rangos de mujeres sanas a pesar de ser portadoras obligadas de ILX. Cada ensayo se realizó en dos ocasiones distintas y se compararon con controles sanos (tabla 2).

El análisis mediante FISH reveló que todas las mujeres con actividad bioquímica compatible con estado de portadora mostraron una sola copia del gen STS, como se muestra en la figura 3.

Tabla I.- Actividad de la SE de los pacientes con diagnóstico clínico de ILX

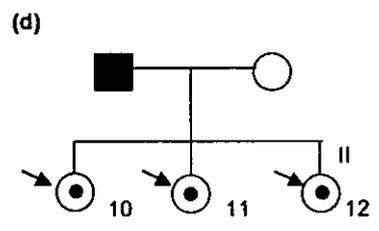
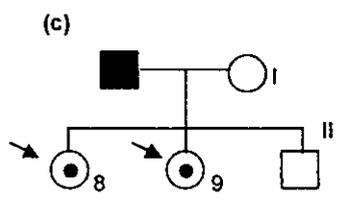
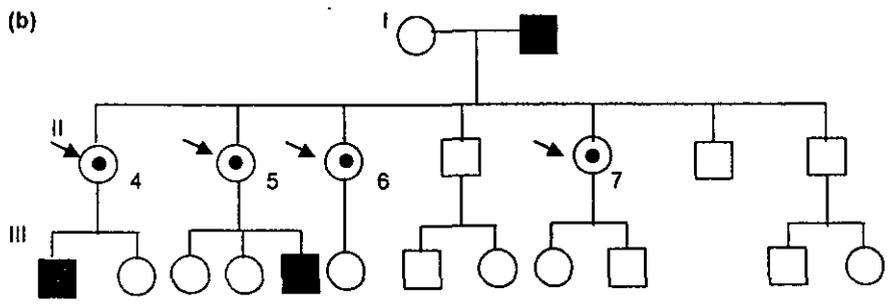
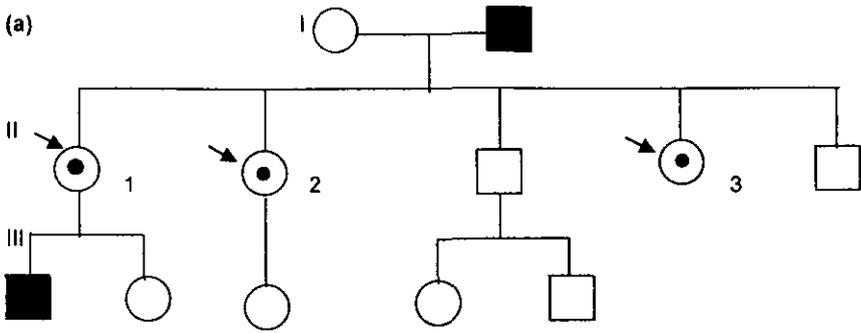
Paciente con ILX	Ausencia del Gen STS	Act. de la SE.	Act. de SE Control masc.
1	+	0.00	0.75
2	+	0.00	0.70
3	+	0.00	0.75
4	+	0.00	0.75
5	+	0.00	0.73

La actividad de la enzima se expresa en pmol/mg/proteína/h



(a) (b) (c)

Fig. 1 Amplificación de los extremos 1-10 del gen STS , en donde (a) es la escalera, (b) control masculino sano y (c) paciente con ILX.



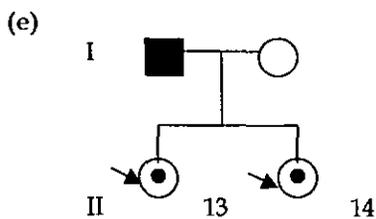


Fig 2.- Árboles genealógicos que ilustra la transmisión de la ILX, ligada al cromosoma X en las familias estudiadas.

Tabla 2.- Resultados de la actividad bioquímica de la SE en las madres de los pacientes comparada con los controles femeninos.

Portadora	Actividad bioquímica Portadora.	Actividad bioquímica Cont. Fem	Act. Bioquímica Cont. Masc.
1	0.19	1.05	0.75
2	0.26	1.20	0.70
3	0.20	1.20	0.75
4	1.10	1.20	0.75
5	0.19	1.10	0.73
6	0.25	1.15	0.75
7	0.25	1.10	0.78
8	0.22	0.99	0.68
9	0.23	1.05	0.79
10	0.23	0.98	0.76
11	1.05	1.15	0.75
12	0.20	0.99	0.75
13	0.23	0.98	0.75
14	0.26	0.89	0.73

La actividad de la enzima se expresa en pmol/mg/proteína/h.

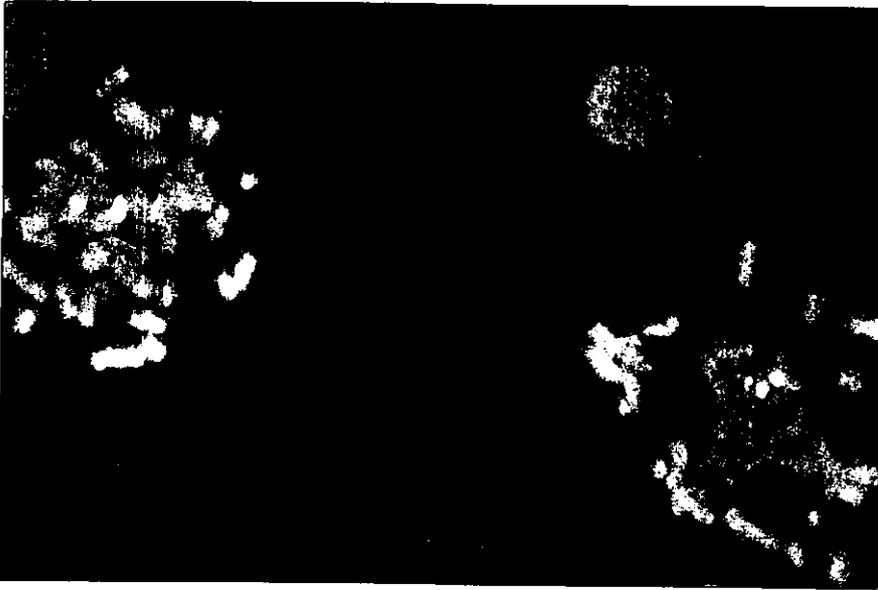
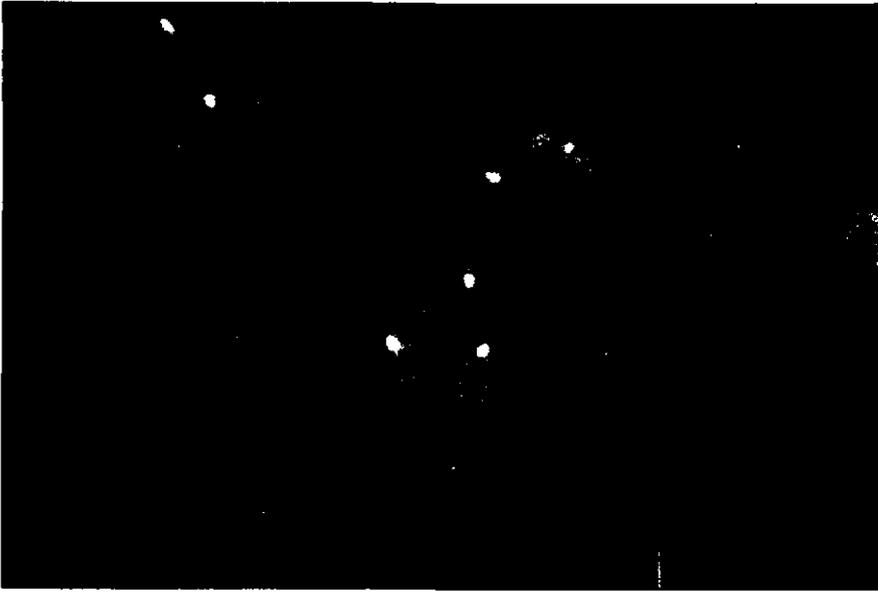


Fig. 3.- Células en interfase y metafase que muestran la presencia de una sola copia del gen STS (espectro naranja), y las dos marcas correspondientes al centrómero (espectro verde).

IX.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por la hiperproliferación y/o retención del estrato córneo de la piel, provocando la descamación anormal de la misma. Con base en criterios clínicos, bioquímicos, moleculares y tipo de herencia se han clasificado 5 tipos de ictiosis que son: Ictiosis vulgar (IV), ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (ILX), ictiosis lamelar, ictiosis bulosa y eritroderma ictiosisforme congénito (1,4,5).

La más frecuente de las ictiosis es la IV con una frecuencia de 1:250 recién nacidos, seguida de la ILX con una frecuencia de 1:2000-6000 varones (11,14). En nuestro país no se conoce la frecuencia y prevalencia de estas entidades, no obstante investigaciones bioquímicas y moleculares realizadas en el departamento de Genética del Hospital General de México han mostrado resultados de un predominio de la ILX en comparación con la IV en una proporción de 10:1 en una población representativa (52). Si además de esto se consideran reportes previos de una prevalencia mayor en razas Mongólicas con respecto a Caucásicas (52), la diferencia de los datos nos permite dar un mayor interés al diagnóstico e identificación de afectados y portadoras en nuestro país con la finalidad de proveer resultados completos y correctos en cada caso.

El presente estudio incluyó a 14 portadoras obligadas de ILX, identificadas por genealogía, hijas de pacientes con diagnóstico clínico de ILX. El análisis bioquímico y molecular de los pacientes se realizó mediante la determinación de la actividad enzimática de la (0.0 pmol/ mg proteína/ hora) y la ausencia de la amplificación de los extremos 5' y 3' del gen STS por PCR, permitiendo así la confirmación del diagnóstico clínico de la ILX en los pacientes afectados.

La identificación de portadoras de la ILX en el servicio del genética del HGM se ha realizado mediante el ensayo bioquímico de la SE. Sin embargo, existe evidencia que en alrededor del 15% de heterocigotas, la identificación por este método no es suficiente para descartar o confirmar el estado de portadora (63). Esto es debido posiblemente a la influencia del control de variables en el proceso las que pueden influir en los resultados de la actividad enzimática, especialmente como sería la pureza, calidad, concentración y condiciones de almacenamiento e hidrólisis espontánea ocurrida durante su conservación (64).

En este estudio la identificación de 14 portadoras obligadas se llevó a cabo con la determinación de la actividad enzimática de la SE y la hibridación *in situ* con fluorescencia ya que por lo antes mencionado se propuso como un método complementario para brindar resultados más confiables en el caso de portadoras de ILX, con delección total del gen STS.

La identificación mediante el ensayo bioquímico de las 14 portadoras obligadas mostró que 12 de ellas (P 1,2,3,5,6,7,8,9,10,12,13 y 14) presentaron actividad de la SE compatible con estado de portadora (0.19-0.26 pmpol/ mg proteína/ hora) y los otros dos casos restantes (P 4 y 11) reportaron actividad enzimática similar a la de los controles sanas, a pesar de ser portadoras obligadas.

El gen STS ubicado en Xp22.3, escapa al proceso de inactivación del cromosoma X postulado por M. Lyon en 1961. Este proceso de inactivación tiene como finalidad obtener la igualdad de expresión de dosis génica en mujeres XX y varones XY. Esta inactivación se realiza al azar en uno de los dos cromosomas X de la mujer, por lo tanto se dice que la mujer es un mosaico natural. Por otra parte, a pesar de que el presente trabajo incluyó el análisis bioquímico y molecular de 14 portadoras de ILX, el grupo de investigación del departamento de Genética del HGM 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. Es posible que estos valores sean el resultado de un patrón de inactivación al azar del cromosoma X. Lo anterior debido a que la actividad del gen STS es siempre menor en el cromosoma X inactivo, posiblemente por la presencia de genes contiguos inactivos (62). Si tomamos en cuenta que aleatoriamente la única copia del gen STS que presentan las portadoras de ILX se encuentran 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 el gen STS expresándose en valores normales la enzima SE, lo que se traduciría en los valores enzimáticos tan bajos observados en las mujeres portadoras de ILX.

Por otra parte, si el 10% de las mujeres en general presentan un patrón de inactivación preferencial del cromosoma X, aún sin daño génico, es posible que en este porcentaje de portadoras se observe un patrón de inactivación preferencial. 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. Si consideramos que más del 90% de los pacientes con ILX presentan una pérdida total del gen STS incluyendo las regiones adyacentes como principal defecto molecular, en las madres de los pacientes resultaría indispensable realizar la hibridación *in situ* para descartar el estado de portadora. Este dato nos permite considerar al FISH como una herramienta útil complementaria en el diagnóstico de portadoras. Cuando la causa de ILX no es la pérdida total del gen, como ocurren en menos del 10% de los casos, la técnica de FISH tampoco sería la adecuada para descartar el estado de portadora. Por otra parte, un porcentaje alto 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. Sólo existe un reporte previo en la literatura que menciona la posibilidad de este tipo de error en el diagnóstico de portadoras de ILX (61). 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 de que 10% de las madres de hijos con ILX son clasificadas incorrectamente como no portadoras de la enfermedad. Aunque lo anterior tiene un fundamento experimental y teórico, es solamente una hipótesis que deberá probarse en trabajos posteriores y con un mayor número de pacientes.

El análisis de las muestras de las 14 portadoras obligadas de ILX con deleción total del gen STS mostró que en 12 el ensayo bioquímico correspondía a la actividad esperada para una portadora. Sin embargo, 2 de los portadoras obligadas tuvieron un actividad similar a la observada en los controles sanos. Mediante la hibridación *in situ* con fluorescencia utilizada como prueba complementaria se confirmó que las 14 madres correspondían a portadoras de la enfermedad. En este caso sólo en dos de las madres se hubiera requerido la aplicación del FISH como prueba complementaria para corroborar el diagnóstico de portadora. Estos datos nos indicaron que aproximadamente el 85% de las heterocigotas con deleción total del gen STS pudieron ser identificadas por la determinación de la actividad bioquímica y que en el resto fue posible su identificación con ayuda de otra prueba complementaria como lo es el FISH.

La utilización de FISH como herramienta en la identificación de portadoras de ILX con deleción total del gen STS resulta exitosa siempre y cuando se parta de preparaciones citológicas con cromosomas metafásicos abiertos con morfología lo más intacta posible para permitir el empalme del material genético de la muestra a la sonda complementaria presente en la sonda. El uso de fluorocromos de visualización directa nos permite atribuir otra ventaja del FISH, ya que la

manipulación del espécimen disminuye provocando así la posible pérdida de la muestra y variables que pudieran afectar en los resultados. El uso de marcaje no radiactivo brinda mayor seguridad a diferencia del marcaje radioactivo que incrementa el riesgo de contaminación durante el procesamiento de la muestra.

Considerando que en más del 90% de los casos de ILX es la delección total del gen STS, la utilización del FISH para la identificación de portadoras resulta una herramienta complementaria de gran utilidad. Sin embargo, cabe mencionar que en menos del 10% el defecto génico corresponde a mutaciones puntuales y delecciones parciales pequeñas la técnica de FISH no es recomendable ya que no permite la identificación de portadoras debido a que en estos casos la sonda utilizada podría hibridar con el segmento del gen presente en el cromosoma de las pacientes. No obstante, si consideramos el bajo porcentaje de mutaciones puntuales y delecciones parciales el FISH resultara de gran ayuda en la identificación de portadoras de ILX (39,44,46,61). Finalmente, la realización de pruebas complementarias para enriquecer el diagnóstico resulta de gran importancia ya que permite conocer los riesgos de recurrencia que realmente corresponden a los pacientes y sus familiares.

X.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

La utilización de técnicas moleculares y bioquímicas en la identificación de portadoras y varones afectados en enfermedades genéticas es de gran importancia ya que de los resultados depende el asesoramiento genético de la enfermedad. En el caso de la ILX que es una entidad de carácter recesivo ligado al cromosoma X, debida en un 90% de los casos a la delección total del gen STS, el diagnóstico de los varones e identificación de portadoras se ha realizado mediante la determinación bioquímica de la SE. Sin embargo, existe evidencia de que en un bajo porcentaje de casos la actividad bioquímica no permite la identificación de heterocigotas. En el presente estudio se observó en un 14.7% de hetrocigotas obligadas no fue posible su identificación mediante el ensayo bioquímico, por lo que se propuso la utilización de una técnica complementaria como el FISH que nos permite visualizar y localizar el gen STS en portadoras con delección total del gen. La combinación de ambos procedimientos permite tener resultados más confiables para proporcionar el asesoramiento genético adecuado en cada caso. Considerando que un 90% de los casos de ILX se deben a delección total del gen STS, la técnica de FISH resulta una herramienta útil para la identificación de portadoras, sin embargo cabe señalar que el FISH también tiene limitantes, dado que no serviría en casos con delecciones parciales o mutaciones puntuales. A pesar de que el ensayo bioquímico ha sido una herramienta práctica en la identificación de portadoras de ILX, los resultados del presente trabajo indican que algunas mujeres pueden presentar actividad enzimática normal, aún a pesar de ser portadoras de ILX. Por lo tanto, en quienes la actividad enzimática está dentro de rangos normales se recomienda realizar estudios moleculares complementarios como la técnica de FISH.

XI.- ANEXO

➤ Preparación de soluciones utilizadas en el FISH.

❖ Solución de 20 XSSC.

Mezclar completamente 132 g de 20 XSSC en 400 mL de agua purificada. Adicionar agua hasta un volumen final de 500 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

❖ Solución de 2 XSSC.

Mezclar 100mL de 20 XSSC con 850 mL de agua y llevar a un volumen final de 1 Lt, ajustar a pH de 7.0. Almacenar a temperatura ambiente.

❖ Solución de desnaturalización.

Mezclar 49 mL de Formamida, 7 mL de 20 XSSC y 14 mL de agua destilada, ajustar a pH de 7.0. Almacenar a 2-8 °C.

❖ Solución deshidratante.

Preparar diluciones V/V a partir de etanol 100% con agua purificada. Almacenar a temperatura ambiente evitando la evaporación del etanol.

❖ Solución de lavado.

Mezclar 105 mL de formamida, 21 mL de 20 XSSC y 84 mL de agua purificada, ajustar el pH a 7.0. Almacenar en refrigeración.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

XII.- REFERENCIAS.

- 1.- Wells RS, Jennings MC. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris. JAMA 1967; 202: 485.
- 2.- Merret JD, Wells RS, Kerr C, Barr A. Discriminant function analysis of phenotype variants in ichthyosis. Am J Hum Genet 1967; 19 (4): 575-85.
- 3.- Shwayder T, Ott F. All about ichthyosis. Pediatric Clin North Am 1991; 38: 835.
- 4.- Scriver Ch, Beaudet A, Sly W. The metabolic and molecular bases of inherited disease, seventh edition. Mc Graw-Hill 1995: 2999-3017.
- 5.- Alpher J.C. Genetic disorders of skin, 2th edition. Toronto. Mosby year book; 1991: 173-75.
- 6.- Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. Br Med J 1966; 1: 947.
- 7.- Armendares S. Citogenética Humana normal y patológica. 1ª. Ed. Interamericana. México, 1986.
- 8.- Linch MJ. Métodos de laboratorio, Interamericana, 9ª. Ed México. 1985.
- 9.- Ham AW. Tratado de Histología. 8va edición. México DF. Interamericana. 1985.

- 10.- Fawcett DW. Tratado de Histología. 11va edición. España. Interamericana 1986.
- 11.- Shapiro LJ, Buxman MM, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. *Lancet* 1978; 2: 756.
- 12.- Nyhan W. Diagnostic recognition of genetic disease. 2nd edition, Philadelphia. USA, 1987.
- 13.- Bonifas JM, Ocular findings in X-linked ichthyosis. *Ophtamologica*, 1991; 3: 152-5.
- 14.- Schynder W. Inherited ichthyosis. *Arch Derm.* 1970; 102: 240-52.
- 15.- Lykkesfeldt G, Nielsen MD, Lykkesfeld AE. Placental steroid sulfatase deficiency: biochemical diagnosis and clinical review. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 49.
- 16.- Bergner EA, Shapiro LJ. Metabolism of DHEA sulphate by subjects with steroid sulphatase deficiency. *J inherit Metab Dis.* 1988; 11: 403.
- 17.- William ML, Elias PM. Stratum corneum lipidis in disorders of cornification. Increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest.* 1984; 74: 1414.
- 18.- Epstein EH, Krauss RM, Schackleton LK. X-linked ichthyosis: Increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein. *Science* 1981; 214: 659-660.

- 19.- Hobkin R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate characteristics and biological role. *Can J Bioch Cell Biol.* 1985; 63: 1127.
- 20.- Dibbelt L, Kuss E. Human placental sterylsulfatase interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition state analogues acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem.* 1991; 372: 173.
- 21.- French AP, Warren JC. Properties of steroid sulfatase and arylsulfatase activities of human placenta *Biochem J.* 1969; 105: 410.
- 22.- Dominguez OV, Valencia SA, Loza AC. On the role of steroid sulfatase in hormone biosintesis. *J Steroid Biochem.* 1977; 8: 491.
- 23.- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SI. Structure of a human lysosomal sulfatase structure. 1997; 5: 277.
- 24.- Vaccaro AM, Salviolo R, Renola I. Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme.* 1987; 7: 115.
- 25.- Munroe DG, Chang PL. Tissue-specific expression of human arylsulfatase C, isoenzymes and steroid sulfatase. *Am J Hum Genet.* 1987; 40: 102.
- 26.- Matsumoto T, Sakura N. Steroid sulfatase activity in nails screening for X-linked ichthyosis. *Pediatr Dermatol.* 1990; 4: 266.
- 27.- Baden HP, Hooker PA, Kubilus J. Sulfatase activity of keratinization tissues in x-linked ichthyosis. *Pediatr Res.* 1980; 14: 1487.

- 28.- Cuevas S, Kofman S, Orozco E, Diaz JC. The biochemical identification of carrier state in mothers of sporadic case of recessive X-linked ichthyosis. *Genet Counsel* 1995; 6: 103.
- 29.- Epstein EH, Leventhal ME. Steroid sulfatases of human leukocytes and epidermal and diagnosis of recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest.* 1981; 67: 257.
- 30.- Cuevas Covarrubias, Kofman Alfaro, Beirana Palencia. Accuracy of the clinical diagnosis of recessive X-linked ichthyosis vs ictiosis vulgaris. *J. Derm.* 1996; 23: 594-597.
- 31.- Cascos,SA. Manual de genética médica.Científica médica, España, 1980.
- 32.- Curnutte JM, Hopkins P. Studing X inactivation. *Letter to lancet.*1992; 339,749.
- 33.- Balabio A, Willard H. Mammalian X-chromosome inactivation and XIST gene. *Current opinion in genetics and develoment,* 1992; 2: 439-47.
- 34.- Philip A, Philippe Cl. X-Chromosome inactivation in mammalias. *Am Rev Genet* 1997; 31: 571-600.
- 35.- Mahandas T, Shapiro LJ, Sparkers MC, Regional assignment of the steroid sulfatase -X-linked ichthyosis locus implication for a non inactivated region on short arm of human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 5779.

- 36.- Mueller C, Walthsstrom J Rogers H. Further evidence for assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp Hum Genet. 1981; 58: 446.
- 37.- Stein C, Hille A. Cloning and expression of human steroid sulfatase. J Boil Chem 1989; 264: 13865.
- 38.- Yen PH, Marsh B, Allem E, Mohandas T, Shapiro LJ, Organization of the human steroid sulfatase gene. Am J Hum Genet. 1987; 41: 248.
- 39.- Ballabio A, Parenti G, Carozo R, Sebastio G: Isolation and characterization of a steroid sulfatase cDNA: genomic deletion in patients with X-chromosome-linked ichthyosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 4519-452.
- 40.- Shapiro LJ, Yen P, Pomerantz D, Martin E, Mohandas T. Molecular studies of deletion at the human steroid sulfatase locus. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 8477.
- 41.- Nomura K, Nakano H, Umeki K. A study of the steroid sulfatase gene in families with X-linked ichthyosis using polymerase chain reaction, Acta Derm Venerol 1995; 75: 340-342.
- 42.- Thompson Mw, McInnes RR, Willard HF. Genética en medicina, 4a. Ed., Masson SA, Barcelona 1996.
- 43.- Morita E, Katoh O, Shinoda S. A novel mutation in steroid sulfatase gene in X-linked ichthyosis. The society for investigative Dermatology Inc J invest Dermatol 1997; 109: 244-245.

- 44.- Valdés-Flores M, Kofman Alfaro SH, Vaca AL, Cuevas-Covarrubias SA: Mutation report a novel partial deletion of exons 2'-10' of the STS gene in recessive X linked ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2000; 114 (3) : 591-3.
- 45.- Basler E, Grompe. Identification of point mutations in steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis. *Am J Genet.* 1992; 50: 483-491.
- 46.- Ballabio A, Ranier JE, Chamberlain JS, Zollo M. Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. *Hum Genet* 1990; 84: 571-572.
- 47.- Bonifas JM, Morley BJ, Oakey RE, Kan YW, Epstein EHJ . 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.
- 48.- Cuevas Covarrubias, Kofman-Alfaro S, Maya-Nuñez G and Diaz-Zagoya JC. X-linked ichthyosis in México: High frequency of deletion in steroid sulfatase encoding gene. *Am J Med Gen.* 1997; 72: 415-416.
- 49.- Cuevas Covarrubias SA, Diaz Zagoya JC, Carrasco E, Miranda Zamora, Kofman Alfaro S. Análisis bioquímico y molecular de pacientes con ictiosis ligada al X y detección de portadoras. *Rev. Méd. Hosp. Gral.* 1997; 60: 177-180.
- 50.- Cuevas Covarrubias, Juárez Oropeza, Miranda Zamora, Diaz Zagoya. Comparative Análisis of human steroid sulfatase activity in prepuberal and postpuberal males and females. *Bioch. And Mol. Boil. Int.* 1993; 30 (4) 691-95.

- 51.- Cuevas-Covarrubias S, Valdés-Flores M, Orozco-Orozco E, Díaz-Zagoya JC and Kofman-Alfaro S. Most "sporadic" case of X-linked ichthyosis are not of novo mutations. *Acta Derm Venereol.* 1999; 79: 143.
- 52.- Cuevas-Covarrubias, Diaz-Zagoya, Rivera-Vega. Higher prevalence of X-linked ichthyosis vs ictiosis vulgaris in México. *Int. J Derm.* 1999; 38 (7): 555-6.
- 53.- Lichter P, Boyle A, Cremer. Analysis of gene and chromosome by non isotopic in situ hybridization *Genet Anal Techn.* 1991; 8: 24-35.
- 54.- From *Methods in Molecular Biology, Vol 33. In situ Hybridization Protocols* K.H.A Choo Copyright,. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1994.
- 55.- Cremer T, Handegent J, Brukner A, et al. Detection of chromosome aberration in the human interphase nucleus, by visualitation of specific target DNAs with radioactive and no radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe LL84 *Hum Genet.*1986; 74 (4): 346-352.
- 56.- Pinkel D, Straume T. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83 (9): 2934-8.
- 57.- *Methods in Molecular Biology, Protocols for Nucleic Acid Analysis by Noradioactive Probes*, Isacc Copyright 1994 Human Press Inc Totowa, NJ.
- 58.- Vanden Veyer IB, Roa BB. Applied molecular genetic techniques for prenatal diagnosis, *Curr Opin Obstrect Gynecol.* 1998; 10 (2) 97-103.

- 59.- Luke S, Shepelsky M. FISH recent advances and diagnostic aspects Cell Vision 1998; 5 (1): 49-53.
- 60.- Wilkinson. The theory and practice of in situ hybridization A practical approach Wilkinson DG IRL press Oxford University, New York. 1993.
- 61.- Ayala Aviram Goldring Phd, Boleslav Golman MD, Irit Netanelov-Shapira, Deletion patterns of the STS gene and flanking sequences in Israeli X-linked ichthyosis patients and carriers: analysis by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization techniques Int. J Derm. 2000; 39: 182-87.
- 62.- Cuevas-Covarrubias, Juárez-Orpeza, Miranda-Zamora. Comparative análisis of human steroid sulfatase activity in prepubertal and postpubertal males and females. Biochem and molec biol inter. 1993; 4: 691-695.
- 63.- Lowis EI, Oakey RE, Steroid sulfatase deficiency: identification of heterozygotes using hydrolysis of dehydroepiandrosterone sulphate by peripheral leucocytes. Ann Clin Biochem 1996; 33: 219-226.
- 64.- Cuevas-Covarrubias, Díaz-Zagoya. El ensayo enzimático de la sulfatasa esteroidea en la ictiosis ligada al X. Rev Fac Méd UNAM. 1992; 35: 3-7