

00361
14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PROYECTO

ANALISIS DEL GEN STS Y REGIONES FLANQUEADORAS
EN LA ICTIOSIS LIGADA AL X

SUSTENTANTE:

Q.F.B. ANA LUISA JIMENEZ VACA

TUTOR: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COMITE TUTORIAL: DRA SUSANA H. KOFMAN EPSTEIN
MARISOL LOPEZ LOPEZ



COORDINACIÓN

SEPTIEMBRE 2002



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de febrero de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Jiménez Vaca Ana Luisa, con número de cuenta 99809724, y número de expediente 3991062, con la tesis titulada: "Análisis del gen STS y regiones flanqueadoras en la ictiosis ligada al X.", bajo la dirección de la Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias.

Presidente:	Dra. Susana Helena Koffman Epstein
Vocal:	Dr. Fabio Abdei Salamanca Gómez
Secretario:	Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias
Suplente:	Dra. Marisol López López
Suplente:	Dr. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya

Sin otro particular, quedo de usted

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de abril de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen	1
Antecedentes	3
Gen STS	6
Secuencias CRI-S232 y G1.3	6
Deleciones en el gen STS	10
Tabla de mutaciones puntuales en el gen STS	12
Planteamiento del problema y Justificación	13
Objetivo	14
Hipótesis	14
Material y Métodos	15
Procedimiento General	16
Determinación Bioquímica de la STS	17
Extracción de DNA (sangre periférica)	17
Cuantificación de DNA	19
Condiciones generales de la reacción de PCR	19
Tabla de oligonucleótidos para el gen STS	20
Tabla de oligonucleótidos para regiones flanqueadoras del gen STS	21
Técnica de electroforesis	22
Purificación de templados para secuenciar (elución)	23
Reacción de Secuenciación	24
Método para obtener preparaciones cromosómicas	25
Procedimiento para realizar FISH	26
Reactivos para FISH	28
Resultados	30
Discusión	41
Conclusiones	46
Referencias	47

RESUMEN.

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación o retención del estrato córneo, lo que condiciona descamación anormal de la piel. La ictiosis ligada al X (ILX), es una enfermedad causada por la deficiencia de la sulfatasa de esteroides (STS), presenta una frecuencia de 1:2000-6000 varones recién nacidos vivos. La mayoría de los pacientes con ILX presentan delección total del gen STS y regiones flanqueadoras debido a la presencia de secuencias repetidas en número bajo de copias G1.3 y CRI-S232, ubicadas en ambos lados del gen STS. Se ha propuesto la recombinación homóloga como la causa más frecuente de la delección. El presente trabajo incluye 85 pacientes con ILX y 85 madres portadoras de ILX, identificados mediante genealogía, ensayo bioquímico de la STS y PCR del gen STS. Se identificó en 5 pacientes, una mutación puntual, una microdelección de 3 bases y 3 delecciones parciales del gen STS y se determinaron los puntos de ruptura del gen STS y regiones flanqueadoras a los 80 pacientes restantes con ILX que mostraron delección completa del gen STS. En estos pacientes se observaron 3 grupos con diferentes patrones de rupturas. El primer grupo (40 %) implicó los *loci* DXS1139 y DXF22S1 y el segundo grupo (31 %) los *loci* DXS1139 y DXS278. Estas regiones están compuestas de secuencias CRIS-232 y G1.3 previamente reportadas. Por último, el 29 % restante presentó rupturas no descritas anteriormente muy heterogéneas hacia ambos extremos del gen STS y en regiones sin secuencias CRI-S232.

La segunda parte de nuestro estudio consistió en determinar la utilidad de la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) dependiendo de la magnitud de la delección observada en el gen STS en pacientes con ILX. El análisis de la técnica de FISH aplicada a las 85 madres de los pacientes con ILX mostró que 94 % de los casos ($n=80$) presentaban delección total del gen STS y se confirmó el diagnóstico de portadoras de ILX al observarse solo 3 marcas en las metafases (1 marca de color rojo fluorescente que identifica al gen STS y 2 marcas verdes fluorescentes que identifican los centrómeros del cromosoma X, mientras que 6% de los pacientes ($n=5$) presentaron alteraciones en el gen STS (una mutación puntual en el exón 9, una

microdelección de 3 bases en el exón 7 y 3 deleciones parciales). El análisis por la técnica de FISH en las madres de estos pacientes demostró en 4 casos que las metafases presentaban 4 marcas fluorescentes como en personas normales: 2 marcas rojas que identifican el gen STS, y 2 marcas verdes que identifican los centrómeros de los cromosomas X. Sólo en un caso donde el análisis por PCR mostró una delección del 83 % del gen (del exón 2 a la región DXS1133), la técnica de FISH solo reveló 3 marcas en las metafases, indicando con ello que se trataba de una portadora.

ANTECEDENTES

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación o retención del estrato córneo, lo que condiciona descamación anormal de la piel. El término ha sido usado por más de 2000 años y proviene de la raíz griega "Ichthys" (ictios) que significa pez (1). Se conoce en la literatura china e hindú desde el siglo XIX como "enfermedad de piel de serpiente" y en la época del médico árabe Avicenna como "albarras nigra". La primera descripción en la literatura médica fue hecha por Robert William en 1808 y se encuentra en la obra "On cutaneous Diseases". Alibert consideraba que era causada por vivir en áreas cercanas a corrientes de agua o mar o por ingestión de pescado en estado de putrefacción. En 1884 Fox reportó el caso del "niño cocodrilo" cuya madre fue atemorizada por un cocodrilo durante el embarazo. En 1933 Cockaine fue el primero en clasificar genéticamente la enfermedad. Posteriormente fue reclasificada por Greither en 1964, Touraine en 1958 y Wells & Kerr en 1965 (2-5).

De acuerdo a los criterios clínicos, moleculares y patrón de herencia, las ictiosis se clasifican actualmente en: ictiosis vulgar (IV), ligada al X (ILX), bulosa, lamelar y eritrodermia ictiosiforme congénita no bulosa (2, 6, 7). El diagnóstico diferencial de la ILX es principalmente con la tipo IV. En la **tabla I** se describen las principales características clínicas de las ictiosis.

La ictiosis ligada al X (ILX) es una entidad clínica que afecta 1 de cada 2,000-6,000 varones (8,9). Se caracteriza clínicamente por la presencia de descamación anormal, secundaria al engrosamiento del estrato córneo. Las escamas son oscuras y muestran distribución generalizada de predominio en extremidades y tronco respetando cara, palmas de las manos y plantas de los pies. En ocasiones se asocia criptorquidia en pacientes y retardo en la labor de parto en portadoras y opacidades corneales en ambos (2).

En 1978 Shapiro y colaboradores, al cultivar fibroblastos de piel en pacientes con ILX demostraron la deficiencia de la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides (STS) como causa de esta enfermedad (10)

Paralelamente, estudios en madres con deficiencia placentaria de esta enzima reportaron niveles bajos de estriol y retardo en la labor de parto asociados a niveles bajos de la actividad de la STS (11). El seguimiento de las madres demostró la presencia de la ILX en los productos. De esta manera, se descubrió en forma independiente la deficiencia de la STS en pacientes con ILX y su asociación con las madres que presentaban dicha alteración a nivel placentario (12, 13).

Las sulfatasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar las uniones éster-sulfato de varios esteroides sulfatados, a esta actividad se le conoce como "arilsulfatasa" (12). Se han descrito seis arilsulfatasas : ARSA, ARSB, ARSC, ARSD, ARSE y ARSF. Estas son codificadas por genes diferentes, se purifican en forma independiente, tienen pH óptimos distintos y poseen diferentes susceptibilidades a inhibidores (**tabla II**).

La STS ó aril sulfatasa C es una enzima microsomal, unida estrechamente a la membrana, tiene un peso molecular de 62 kDa y una vida media de 4 días (18). La STS se expresa virtualmente en todos los tejidos. Tiene como sustratos a los sulfatos de 3- β -hidroxiesteroides y su acción consiste en hidrolizar el radical sulfato de estos compuestos. Su pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 7.5 (19).

Evidencias químicas y genéticas parecen indicar que la arilsulfatasa C comprende dos isoenzimas "s" y "f" (s de *slow* y f de *fast*) caracterizadas por una movilidad electroforética diferente, codificadas por genes distintos, en cuyo caso únicamente la forma s correspondería a la STS propiamente dicha (20). Estas isoformas ("s" y "f") ligadas al cromosoma X son producto de genes diferentes y no son consecuencia de modificaciones postraduccionales del mismo producto génico. La expresión de las dos variantes es tejido específico: la forma "s" es más abundante en placenta, tiroides, corazón, vaso, músculo esquelético y glándula suprarrenal, mientras que la forma "f" se detecta en hígado, riñón y páncreas. Aunque ambas comparten algunas características bioquímicas, difieren en sus estructuras proteicas, pH óptimo, labilidad al color, propiedades antigénicas y especificidad a sustratos. La forma "s" muestra actividad específica hacia los sustratos naturales de la STS y la forma "f" tiene solamente de 2 a 7% de la actividad de la STS (21-23).

Tabla I. Características clínicas de las ictiosis.

ENFERMEDAD	HERENCIA	INCIDENCIA	INICIO	ESCAMA
Ictiosis vulgar	Autosómica dominante	1 : 250 rnv *	3-12 meses mejora con la edad	Fina
Ictiosis ligada al X	Ligada al X	1:2000 a 6000 varones	0-3 meses mejora con la edad	Grande, Oscura y adherente
Ictiosis lamelar	Autosómica recesiva y dominante (rara)	1:300,000 rnv *	Al nacimiento, persistente	Larga, gruesa, plateada, bordes elevados
Eritrodermia Ictiosiforme congénita	Autosómica recesiva	1:300,000 rnv *	Al nacimiento, persistente	Fina blanca
Ictiosis bulosas	Autosómica dominante	1:300,000 rnv *	Al nacimiento, puede mejorar con la edad	Verrugosa, gruesa y oscura

* rnv = recién nacido vivo.

Tabla II. Características de las arilsulfatasas

Enzima	Substrato	pH optimo	Inhibidor	Enfermedad relacionada con su deficiencia	Referencia
ARSA	Sulfato Dermatán	Ácido	Fosfato	Leucodistrofia meta cromática	13
ARSB	Cerebrósidos sulfatados	Ácido	Bario	Mucopolisacaridosis tipo V	14
ARSC	Esteroides sulfatados	Neutro o alcalino	CN-	Ictiosis ligada al X	15
ARSD	*	*	*	*	16
ARSE	*	Alcalino	Warfarina	Condrodistrofia punctata	17
ARSF	*	*		*	16

* no se conoce

La STS madura comprende 561 aminoácidos, tiene un péptido guía de 22 aminoácidos hidrofóbicos que corresponden a una señal polipeptídica que es escindida postraduccionalmente para generar a la STS madura. Presenta intercalados 4 sitios con residuos de aminoácidos con grupos R-N además de una cadena de varios residuos de *aminoácidos ricos en treonina y serina en su extremo carboxilo en donde pueden unirse carbohidratos* (24).

GEN STS.

El gen de la STS ha sido clonado y caracterizado. Contiene 10 exones y se extiende sobre una región de 146 Kb en la porción distal del brazo corto del cromosoma X (Xp 22.3), cerca de la región pseudoautosómica. Presenta dos regiones que no se transcriben, una región 5' de por lo menos 206 pb y otra región 3' de 668 pb, intercalada por una secuencia de marco abierto de lectura de 1683 pb. Tiene además una señal de poliadenilación (AATAAA) de 13 pb antes del comienzo de la cola poli-A (26) (**Figura 1**).

El gen STS tiene su homólogo no funcional (pseudogén) en los brazos largos del cromosoma Y (Yq11.2). La homología entre el gen funcional y el pseudogén es del 90 % 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 (**Figura 2**) (25).

SECUENCIAS CRI-S232 Y G1.3

Estudios sobre las deleciones del gen STS sugieren que las rupturas se deben a la existencia de 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 (31-33, 43-45). **Figura 3**.

Las secuencias CRI-S232 presentan una secuencia de 7 kb y se organiza en 4 regiones designadas como a, b, c y d (como lo muestra la figura abajo); la secuenciación de b y c revela que éstas contienen VNTRs (repeticiones en tándem en número variable), designados como elementos RU2 y RU1 respectivamente, con altos contenidos de GC e hipervariables en los *loci* del cromosoma X y con menos variabilidad en los *loci* del cromosoma Y. La secuenciación de las regiones a y d mostró secuencias estables. El elemento RU1 tiene 30 pb repetidas en el cromosoma X con 60 % de GC, además muestra una variación mínima entre los individuos. El elemento RU2 es hipervariable en el *locus* CRI-S232 del cromosoma X, presenta un rango que de 0.6 - 23 kb entre individuos y contiene 65 % de GC (46).

Las secuencias CRI-S232 presentan : Una secuencia de 7 kb y se organiza en 4

regiones

65 % de GC

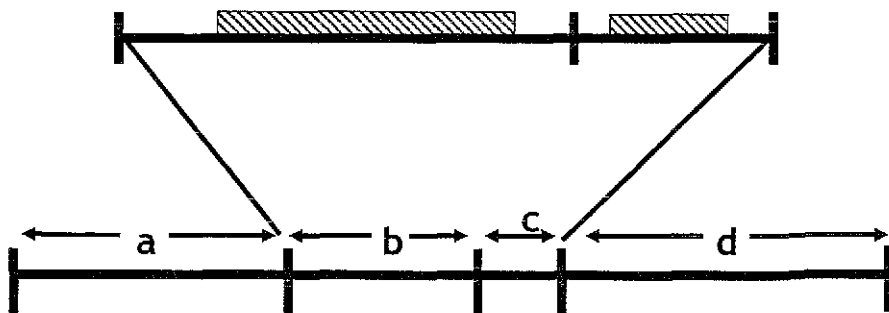
0.6 a 23 kb repetidas

(VNTRs)
RU2

60 % de GC

30 pb repetidas

(VNTRs)
RU1



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La clona CRI-S232 en el cromosoma X es altamente polimórfica y también se ha identificado en el cromosoma Y aunque en menor proporción.

La sonda CRI-S232 hibrida en el cromosoma X y en el cromosoma Y con los siguientes *loci* (31, 32, 46) :

Sonda CRI-S232 :	Cromosoma X (<i>loci</i>)	Cromosoma Y (<i>loci</i>)
S232A2	DXS1139	
GMGX9	DXS237	
G1 3	DXF22S1	
S232B2	DXS278	
dic56	DXS143	
782	DXS85	
pD2	DXS43	
pDP230		DXYS20
pDP411a		DXYS28

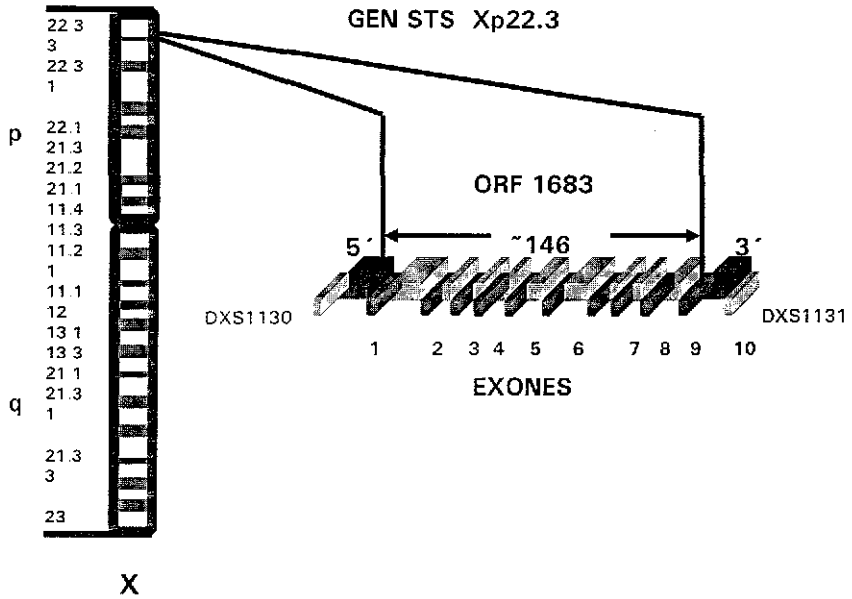


Figura 1. Representación gráfica del gen STS, localizado en la región Xp22.3 del cromosoma X. Se extiende en una región de ~146 kb, con 10 exones de diferente tamaño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

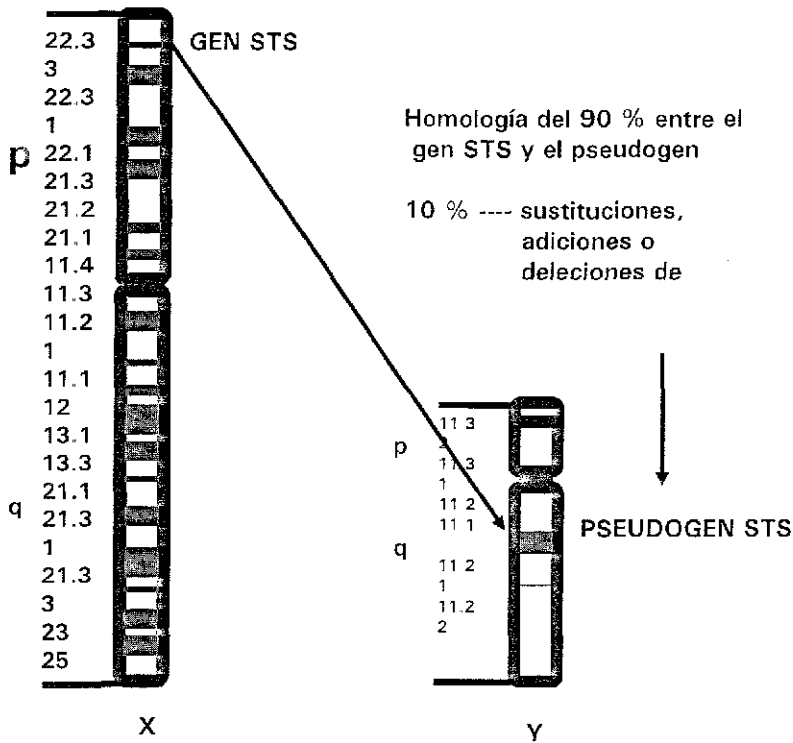


Figura 2. Localización cromosómica del pseudogén. En Yq11.2. Presenta 10 % de pequeñas sustituciones, adiciones o deleciones que lo hacen no funcional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

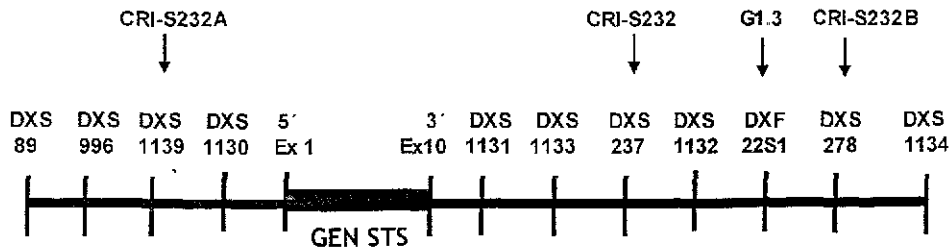


Figura 3. Representación gráfica del gen STS y regiones flanqueadoras. Las flechas indican la posición de secuencias CRI-S232 en DXS1139, DXS237 y en DXS278, en DXF22S1 se encuentran presentes las secuencias G1.3.

DELECCIONES EN EL GEN STS.

Reportes en la literatura internacional indican que 90% de los pacientes con ILX presentan deleciones totales del gen STS (~146 kb) y regiones flanqueadoras y un 10 % de los pacientes presentan deleciones parciales del gen STS o mutaciones puntuales como causa de la enfermedad (24, 26-29).

En 1989 Ballabio y col. demuestran la deficiencia del gen STS en 57 pacientes europeos y hacen una clasificación de 4 grupos (A, B, C, D) de acuerdo a la deleción que presentaban estos pacientes

Grupo A: 77 % de los pacientes (n=44), mostró una deleción completa del gen STS y se extiende hacia el extremo 3' hasta la región DXS237.

Grupo B: 5 % de los pacientes (n=3) mostró una deleción completa del gen STS que se extiende hacia el extremo 3' hasta la región DXS1133.

Grupo C: Un paciente (2%), mostró una deleción parcial hacia el final del extremo 3'.

Grupo D: 16 % de los pacientes (n=9), no mostró evidencias de deleción del gen STS (30).

Por otro lado en 1990 Yen PH y col. al analizar un grupo de 26 pacientes encuentran que el 88 % de estos presentan una deleción del gen STS y regiones flanqueadoras de la región DXS1139 a la región DXS278 (31, 32). En 1993 Schaefer y col al

caracterizar los puntos de ruptura en algunas enfermedades ligadas al cromosoma X, observó 4 modelos de deleción en la ILX, siendo la ruptura más común la que va de la región DXS1139 a la región DXF22S1(33-36). Por último dos reportes más realizados a 12 pacientes japoneses en 1998 y a 22 pacientes israelitas en el 2000 indican que más del 80 % de estos pacientes presentan la deleción DXS1139 a la región DXF22S1 (28, 34, 36).

Los modelos de deleción más comunes que se presentan entre los pacientes con ILX son entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 (28, 34, 36) y entre las regiones DXS1139 y DXS278 (31, 32) Se postula que estos tipos de deleción son causados por la recombinación entre las regiones S232A (DXS1139) y S232B (DXS278) y entre S232A (DXS1139) y G1.3 (DXF22S1), debido a su homología. (32, 46).

Actualmente se han reportado 7 deleciones intragénicas: en los exones 1-5, 2-5, 2-10, 7-10, 10 y dos en el extremo 5'; y 11 mutaciones puntuales **tabla III** (37-42, 53).

Tabla III. Mutaciones puntuales del gen STS reportadas en la literatura.

EXON	NUCLEOTIDO	CAMBIO DE BASE	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	POSICIÓN DEL AMINOÁCIDO	REFERENCIA
7	1236	G - A	Gly-Stop	322	Morita et al. 1997
7	1226	C - T	Ser-Leu	341	Basler et al. 1992
8	1344	G - C	Gly-Arg	358	Oyama et al. 2000
8	1371	C - T	Gln-Stop	367	Oyama et al. 2000
8	1320	T - A	Trp-Arg	372	Basler et al. 1992
8	1320	G - C	Trp-Pro	372	Alperin et al. 1997
8	1552	G - T	Gln-Stop	422	Alperin et al. 1997
9	1567	G - A	Arg-Hist	432	Valdes et al. 2001
9	1543	A - G	Hist-Arg	444	Alperin et al. 1997
9	1567	G - A	Cys-Tyr	446	Basler et al. 1992
9	1882	A - C	Glu-Pro	560	Sugawara et al. 1999

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Informes en la literatura señalan que 90 % de los pacientes con ILX presentan pérdida total del gen STS y secuencias flanqueadoras.

Las regiones mas frecuentemente implicadas se localizan entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 (28, 34, 36) y entre las regiones DXS1139 y DXS278 (31, 32). En ambos casos se ha postulado como causa de estos rompimientos, la recombinación homóloga entre secuencias CRI-S232 y G1.3.

Por otra parte, la técnica de FISH se ha utilizado como prueba complementaria para el diagnóstico de portadoras de ILX (28). Sin embargo considerando los tamaños diferentes de las deleciones observadas en los pacientes, es importante determinar hasta que punto esta prueba puede ser aplicada.

Con base en los antecedentes presentados, el planteamiento a nuestro problema sería:

Identificar los puntos de ruptura del gen STS y regiones flanqueadoras en una muestra de pacientes mexicanos con ILX.

Determinar si la técnica de FISH puede ser utilizada en la identificación de portadoras, considerando la variabilidad en los puntos de ruptura

OBJETIVO

Determinar los puntos de ruptura del gen STS y regiones flanqueadoras en los pacientes con ILX.

Determinar si la técnica de FISH tiene aplicación en la identificación de portadoras de ILX dependiendo del tamaño de la deleción observada en el gen STS

HIPOTESIS

Los puntos de ruptura del gen STS en pacientes con ILX presentan sitios heterogéneos.

Sólo se puede diagnosticar mediante FISH a portadoras de ILX cuando la deleción del gen STS es total

OBJETIVO

Determinar los puntos de ruptura del gen STS y regiones flanqueadoras en los pacientes con ILX.

Determinar si la técnica de FISH tiene aplicación en la identificación de portadoras de ILX dependiendo del tamaño de la deleción observada en el gen STS

HIPOTESIS

Los puntos de ruptura del gen STS en pacientes con ILX presentan sitios heterogéneos.

Sólo se puede diagnosticar mediante FISH a portadoras de ILX cuando la deleción del gen STS es total

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Selección de los sujetos de estudio :

85 pacientes y 85 portadoras con ILX

Criterios de Inclusión:

Pacientes y portadoras con ILX identificados mediante genealogía, ensayo bioquímico de la STS y PCR del gen STS.

Criterios de Exclusión

Individuos que no deseen participar en el estudio

Criterios de Eliminación

En el caso de mujeres que tengan hijos con ILX pero no sean portadoras.

Cuando no sea posible realizar todos los procedimientos requeridos en la investigación

DISEÑO DEL ESTUDIO.

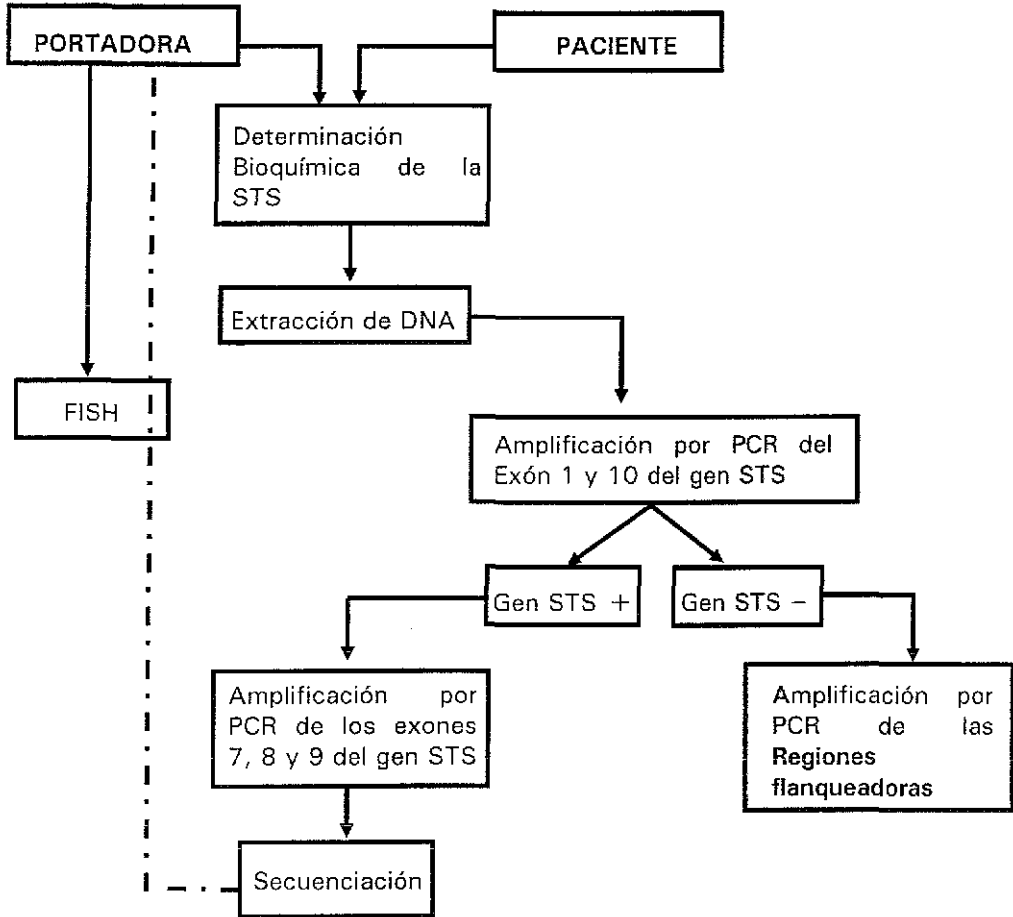
Prolectivo, transversal y descriptivo

Tiempo estimado de estudio : 2 años

Nivel de medición : Nominal

Muestreo : por Juicio

PROCEDIMIENTO GENERAL



Determinación bioquímica de la STS (47, 48).

- a).- Tomar 10 ml de sangre, empleando EDTA como anticoagulante.
- b).- Obtención de leucocitos.- Centrifugar la muestra sanguínea (10 ml) a 1400 rpm durante 6 minutos. Posteriormente, separar el suero sanguíneo y añadir 5-7 ml de Cl NH_4 , dejar reposar de 3-5 minutos y centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos con el fin de lavar el botón de leucocitos obtenido. Repetir este proceso de lavado 3 ocasiones.
- c).- Ensayo de la actividad enzimática.- Para su realización utilizar la población de leucocitos obtenida de la manera previamente descrita. Resuspender la muestra en 1 ml de amortiguador-tris 0.014M, y 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. Incubar la reacción utilizando como sustrato a la $\text{DEHAS-}^3\text{H}$ (10 μl , 33 nmol), para obtener como producto final a la $\text{DHEA-}^3\text{H}$. El volumen final de la reacción es de 200 μl a una temperatura de 37° C. Con el propósito de detener la reacción y extraer el producto final ($\text{DHEA-}^3\text{H}$) agregar 1 ml de benceno frío (Merck, grado analítico), agitando vigorosamente en vortex durante 2 minutos y centrifugando 5 minutos a 2500 rpm. De la fase superior (sobrenadante de benceno), extraer 600 μl , y colocar 5 ml de líquido de centelleo para posteriormente ser leídos por espectrofotometría de centelleo de líquidos. Cada uno de los ensayos se realiza por duplicado, contra controles masculinos y femeninos sanos, incluyendo un blanco. En los casos de pacientes con ILX no se detecta actividad enzimática.

EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA (49).

Extraer asépticamente 5 ml de sangre periférica.

Colocar la sangre en un tubo de ensayo con EDTA.

Identificación de la muestra:

- Nombre completo, Institución de procedencia, Médico que solicita el estudio, Datos clínicos.

Procedimiento :

Siguiendo la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington (1985) (50) y de Kempter y Grossbadern (1992) (51).

- 1 - Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris-Tritón-Sacarosa), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
- 2.- Centrifugar a 3000 rpm/ 6 minutos; decantar con cuidado.
- 3.- Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS . Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
- 4.- Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender.
- 5 - Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior).
- 6 - Al botón limpio agregar 570 μ l de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 μ l de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10 %. Agitar 5 minutos.
Observar si hay consistencia viscosa y agregar 200 μ l de NaCl saturado. Agitar 10 minutos.
- 7.- Centrifugar a 11500 rpm / 30 minutos a 4 °C
Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100 mm estéril.
- 8.- Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 °C para precipitar el DNA.
- 9.- Tomar el DNA con una varilla de vidrio, enjuagar el DNA con etanol al 70 %, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender el DNA en un microtubo con 250 μ l de agua estéril, colocar en baño maría a 60° C durante 2 hrs.

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA CUANTIFICACIÓN DE DNA (49).

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260 nm y 280nm). A partir de la lectura a 260 nm. (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra:

concentración de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = $A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$

1 D.O $_{280}$ = 50 μg de DNA/ml = 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

La cantidad total de DNA (en μg) se calcula:

μg totales de DNA = conc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) x volumen total (μl)

Además la relación 260/280 permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica.

Una relación menor a 1.5 indica la presencia de proteínas.

CONDICIONES GENERALES DE LA REACCIÓN DE PCR (49, 52).

Volumen total de la reacción 25 μl contenidos en un microtubo de 200 μl .

	DNA (250 ng)	Agua	Amortiguador 10X (Cl_2Mg^+)	dNTPs (1mM)	Oligo F (100 μM)	Oligo R (100 μM)	Taq
Pac.	1 μl	18.05 μl	2.5 μl	3 μl	0.15 μl	0.15 μl	0.15 μl
C +	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C -	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Bco.	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	M Mix	72.2 μl	10 μl	12 μl	0.6 μl	0.6 μl	0.6 μl

Nota : Pac. = Paciente, C + = Control normal, C - = Control con delección, Bco = No contiene DNA. En cada tubo colocar 24 μl de la mezcla de reacción más 1 μl de DNA.

Se utilizó un estuche comercial para PCR de Applied Biosystems.

(Tabla IV). OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA ANÁLISIS DEL GEN STS (29, 53).

LOCUS		Temperatura de alineación (°C)	(pb)
Exón 1 *	F GGC CTA GAA GAA GGT TGA AGG TCC C R AAG AGG TTG GAT GAG ATG GGC ATA C	60	292
Exón 2 *	F TCC TTT ACA GGA AGA TGA AG R CAT TAC CAA CCT GAT AGT TTT	55	141
Exón 3 **	F TTT GTT CTA GGA CTC CCA AT R AGG AGG TTA CCT GAT CGG AC	50	122
Exón 4 **	F CCT GGT CCA GGA ATG GCA TCT R CAA TAC CCA CCG CTG TAT GAA	50	123
Exón 5 *	F ACC ACC CTT TAC ATC ACG GC R CGC CTC CAC CGT TAG CCT CT	60	424
Exón 6 **	F TTT TGC AGG AAC ACT GAG ACT CCG R AAC GTA CCC ACA CTC CAG TCC ATT T	50	137
Exón 7 *	F TCC CCT CCA GGG CAG ATC TTG AAC R CAT TTC TCA CCT TTA TAG ATC CC	55	138
Exón 8 *	F GAT CTT TTA GGA GGA AAA GCA AAC R CAG AGT ACC TGT CCT CAG GCA AGG	55	168
Exón 9 *	F TAT CCC ACA GGA TCA TTG ATG GAC R TTT ACT CAC TGT TCT GAG GTG C	55	122
Exón 10 *	F GAA ATC CTC AAA GTC ATG CAG GAA G R CCT CCA GTT GAG TAG CTG TTG AGC T	60	363

* (29)

** (53)

(Tabla V) OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LAS REGIONES FLANQUEADORAS DEL GEN STS (34).

LOCUS		Temperatura de alineación (°C)	(pb)
DXS89	F CGT TCT CAA CAA TAG ATC ACG	50	166
	R ACT TAC ATT GGC AAT GCA TCC		
DXS996	F AAA TTC TTG CCT AGG CCA CTC TAG G	62	153-171
	R ACG TTG TTC TGG ATC GTA TGC TAG G		
DXS1139	F GCT TGG ATC AGG GCT GGA ATT AG	62	500
	R TTA AAC AAG GGC CAT TCT GCA AG		
DXS1130	F TGT CTC AAC CGT CAA GTC AC	62	367
	R CTT GTC TTT GAA GAT GCT CCC		
GEN STS	5'		
	3'		
DXS1131 *	F CCA AAC TGC CAC TGG TTG AG	58	170
	R CCG TGA TCT CTG ATG AAC CG		
DXS1133	F TGG TAG AAT ACA CTG CAG GTG TGC	68	260
	R CAG CTT GTT AAG TGC TGT CTA TCC		
DXS237	F CAT GTG AGG AAT ACA GGA GCG AA	68	400
	R GCC AAC TCA GCT AAT GAC TGT AG		
DXS1132	F TGC TAC AAG CAT TTC AGA GG	50	152
	R CAA GCT CTG ACA TGT GAC TTC		
DXF22S1	F ATC CAC TCC CCA TCT TAC CTT TCC C	62	262
	R CAA ATA GAC CCC TTC TTG TCT GGG		
DXS278	F CCT TGA GTC TTT GTT CTG GAA CCC	52	210
	R CTA CGT GGT TGA ATG CCT GGA CTC		
DXS1134	F TGA GTA TGT GCT TTG AGC TAG GGT C	50	400
	R CTG CGA ACA ATT CTT TTA GTT CCT C		

* 1% de DMSO (concentración final)

con las siguientes condiciones:

2 min a 94°C; 30 ciclos : 1 minuto de desnaturalización a 94°C ; 1 minuto de temperatura de alineamiento (Tabla IV y V) ; 1 minuto de extensión a 72°C
5 minutos de extensión final, guardar a 4°C ∞ . (29, 34, 53)

TÉCNICA DE ELECTROFORESIS (49).

La electroforesis del DNA es la migración de éste, en base a su carga y peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra, así como la presencia o ausencia de RNA contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada.

Procedimiento:

Volumen 50 ml.

Para Calidad de DNA –gel al 0.8 % con 0.4 g de agarosa,

Para productos de PCR – gel al 1.5 % con 0.75 g de agarosa,

- 1.- En un matraz Erlenmeyer se disuelve la agarosa en 50 ml de TAE 1 X (Tris, Ácido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de microondas (restituir el agua que se pierde por evaporación), dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50 °C, colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg/ml) y vaciar en el porta gel.
- 2.- Dejar solidificar en el portagel colocando el peine.
- 3.- Preparar TAE 1X para llenar la cámara.
- 4.- Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
- 5.- Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir TAE 1X hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
- 6 - Mezclar 10 µl de producto de PCR con 3 µl de amortiguador de carga.
- 7.- Colocar la muestra en el pozo y utilizar una escalera de 100 pb como referencia
- 8.- Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
- 9.- Dejar correr la muestra durante 1hr (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
- 10.- Observar en el transiluminador de luz ultra violeta.

PURIFICACIÓN DE TEMPLADOS PARA SECUENCIAR (POR ELUSIÓN).

KIT QUIAEX II (QUÍMICA VALANER CAT. No. 20051) (49).

Los fragmentos de PCR deben ser purificados antes de la reacción de secuenciación para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzima, DNA, etc.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Cortar la banda del gel y pesarla.
- 2.- Colocar amortiguador QX1 (3 veces en vol. de acuerdo al peso) y QIAEX II 5 μ l (resina), mezclar con vortex.
- 3.- Incubar por 6 minutos a 50 °C (mezclando la muestra por vortex cada 3 min.)
- 4.- Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm, decantar
- 5.- Colocar 500 μ l de amortiguador QX1 mezclar por vortex
- 6.- Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm, decantar y eliminar los residuos de este buffer.
- 7.- Agregar 500 μ l de amortiguador PE, mezclar por vortex, centrifugar a 10,000 rpm/1 min (este paso se realiza 2 veces), decantar y eliminar los residuos del amortiguador PE.
- 8.- Secar la muestra por efecto de temperatura a 50 °C.
- 9.- Colocar 20 μ l de agua inyectable y mezclar
- 10.- Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm y pasar el agua a un microtubo limpio.
Cuantificar la cantidad del producto de PCR purificado, midiendo la absorbancia a 260 nm o por algún otro método

REACCION DE SECUENCIACION (Applied Biosystems) (49).

1.- Por cada reacción, mezcle los siguientes reactivos en un microtubo de 200 μ l previamente etiquetado:

Reactivo	Cantidad
Mezcla de reacción "BigDye Terminator"	2.0 μ L
Templado 100 ng/ μ L	1 μ L
Oligonucleótido (110 μ M)	1 μ l
Agua destilada	16 μ L
Volumen final de la reacción:	20 μ L

Mezcla de reacción BigDye Terminator (Parte No. 4303152) :

- ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP marcados por fluorescencia
- Los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTPs)
- Tris-HCl (pH 9.0), MgCl₂
- AmpliTaq DNA polimerasa

CICLOS DE TEMPERATURA

25 ciclos: 96°C 5 minuto; 96°C 35 segundos; 50°C 25 segundos; 60°C 4 minutos; enfriar a 4 °C.

PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE EXTENSIÓN.

Eliminar los ddNTPs marcados por fluorescencia presentes en exceso, para permitir una secuenciación limpia y evitar errores en la interpretación de resultados.

Método por columnas Centri Sep (Parte No. 401262 Applied Biosystems).

Secar la muestra en un concentrador de vacío (no aplicar calor y no secar en exceso).

MONTAJE DE LA MUESTRA.

Añadir 20 µl de Amortiguador de carga TSR (*Template supression reagent*), Applied Biosystems.

Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa, desnaturalizar a 95 °C durante 3 minutos, colocarlas inmediatamente en hielo.

Colocar las muestras en el secuenciador Automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

MÉTODO PARA OBTENER PREPARACIONES CROMOSÓMICAS (54).

Cariotipo en linfocitos de sangre periférica.

Tomar 2 ml de sangre con jeringas estériles, previamente heparinizadas

Siembra de la muestra :

- 1.- Utilizar 2 frascos de 5ml de medio de cultivo KARYO MAX BONE MARROW KARYOTYPING (catálogo No 11676-061 Accesolab) por cada paciente.
- 2.- Colocar 200 μ l de fitohemaglutinina y adicionar 12 gotas de sangre.
- 3.- Incubar 70 hrs y 30 minutos a 37 °C
- 4.- Agregar 80 μ l de colcemid (10 μ g/ml) e incubar durante 20 min a 37 °C.
Vaciar el contenido de los frascos en tubos cónicos de 15 ml y centrifugar a 3000 rpm / 6 minutos.
- 5.- Decantar el sobrenadante.
- 6 - Resuspender el botón con 12 ml de solución hipotónica a 37 °C , en agitación constante. Incubar por 40 minutos. a 37 °C. Antes de centrifugar colocar 3 gotas de fijador frío a -20 °C en agitación constante; centrifugar a 3000 rpm / 6 minutos , decantar el sobrenadante.
- 7.- Agregar fijador frío a -20 °C (3:1 metanol absoluto - ácido acético glacial) gota a gota, con agitación constante y reposar la muestra 30 minutos a 4°C
Centrifugar a 3000 rpm / 6 minutos, decantar el sobrenadante.
- 8.- Realizar varios lavados con fijador frío, centrifugar la muestra a 3000 r.p.m. por 6 minutos y decantar el sobrenadante, hasta que se observe limpio el paquete celular (botón blanco y sobrenadante transparente), no excediendo de 4 lavados)
- 9.- Gotear la muestra con pipeta Pasteur en portaobjetos (previamente preparados y a -20 °C), procurando que las gotas se extiendan completamente en éste.
Dejar secar al aire libre.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN STS MEDIANTE FISH (HIBRIDACIÓN *IN SITU*) PROTOCOLO DE VYSIS) (55).

La hibridación *in situ* se realizó en metafases y núcleos. Para este fin se empleó la sonda específica LSI (Locus Specific Identifier) STS, de Vysis con fluorescencia naranja para hibridar en la banda Xp22.3 y se utiliza como control interno al centrómero del X para hibridar en la región Xp11.1-q11.1 (locus DXZ1), con fluorescencia verde; El análisis se llevó a cabo en microscopio de fluorescencia.

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR EL FISH (28, 56-61)

TRATAMIENTO DE LAMINILLAS

- 1.- Gotear 20 μ l de la muestra con micropipeta en el portaobjetos (previamente preparados y a -20°C), procurando que las gotas se extiendan completamente en éste. Dejar secar a 37°C 1 hr.
- 2.- Marcar por debajo las laminillas con punta diamante el área que contiene las metafases o núcleos.

DESNATURALIZACIÓN DE LAMINILLAS

- 1 - Colocar en baño maría a $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ un vaso de coplin con solución de desnaturalización (70% formamida/2X SSC) mínimo 30 minutos antes de colocar los portaobjetos a hibridar
- 2.- Meter las laminillas en la solución de desnaturalización 5 minutos.
Nota: se recomienda meter solo 4 laminillas por vaso de coplin
- 3.- Deshidratar las laminillas con etanol frío (-20°C) al 70%, 85% y 100% 1 minuto en c/u.
- 4.- Secar las laminillas a temperatura ambiente o a $45-50^{\circ}\text{C}$ para evaporar los residuos de etanol.

PREPARACIÓN DE LA SONDA

- 1.- En un microtubo de 0.5 ml colocar : 7 μ l de amortiguador de hibridación LSI , 1 μ l de sonda STS y 2 μ l de agua
- 2 - Centrifugar el tubo de 1 a 3 segundos y dar un vortex para mezclar bien
- 3 - Colocar el tubo con la mezcla en baño maría a $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos

- 4 - Quitar el tubo del baño maría y colocarlo a una temperatura de 45- 50 °C hasta el momento de colocar la mezcla sobre la laminilla

Nota : se recomienda colocar la sonda inmediatamente después de desnaturalizarla

HIBRIDACION DE LA SONDA CON LAS METAFASES.

- 1.- A las laminillas deshidratadas y secas aplicar en el área marcada 10 µl de sonda y colocar un cubre objetos, sin presionar evitando que queden burbujas.
- 2.- Sellar alrededor del cubreobjetos con cemento rubber
- 3 - Incubar las laminillas a 37 °C en cámara o caja húmeda, de 6 – 16 hrs como mínimo y 48 horas como máximo

LAVADO DE LAS LAMINILLAS

PROCEDIMIENTO DE LAVADO CON FORMAMIDA

Preparación de las soluciones de lavado:

3 vasos de coplin con 50% formamida/2X SSC a temperatura ambiente

1 vaso de coplin con 70 ml de 2X SSC y otro vaso de coplin con 70 ml de 2X SSC /0 1 % NP-40

Colocar los 5 vasos de coplin en baño maría a 46 ± 1 °C por lo menos durante 30 minutos (preparar las soluciones el mismo día)

Nota: se recomienda usar estas soluciones solo para 4 laminillas.

- 1.- Quitar el cubreobjetos con cuidado de la laminilla y sumergirla en un vaso de coplin con 50% formamida/2X SSC, agitando la laminilla 3 segundos manualmente.
- 2 - Sacar la laminilla después de 10 minutos.
- 3.- Sumergir la laminilla en otro vaso de coplin con 50% formamida/2X SSC, agitando 3 segundos sacar la laminilla después de 10 minutos.
- 4.- Sumergir la laminilla en otro vaso de coplin con 50% formamida/2X SSC, agitando 3 segundos sacar la laminilla después de 10 minutos.
- 5.- Sumergir la laminilla en otro vaso de coplin con 2X SSC agitando 3 segundos sacar la laminilla después de 10 minutos.

- 6 - Sumergir la laminilla en otro vaso de coplin con 2X SSC /0.1 % NP-40 SSC agitando 3 segundos sacar la laminilla después de 5 minutos.

VISUALIZACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

- 1.- Secar la laminilla a temperatura ambiente (en la oscuridad).
- 2.- Aplicar 10 μ l de DAPI II y colocar un cubre objetos. Se usa DAPI II para contraste y poder visualizar hasta 3 fluorómetros diferentes en este caso, espectro color naranja (marca del gen STS) y espectro color verde (para centrómeros del X).
- 3 - Ver las laminillas en un microscopio de fluorescencia con el filtro correspondiente.
- 4.- Guardar las laminillas en la oscuridad a -20 °C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA FISH.

Solución 20X SSC .

Pesar 132 g de polvo 20X SSC y adicionar 400 ml de agua purificada, mezclar y aforar a volumen final de 500 ml. Medir pH y ajustar a 5.3 con HCl. almacenar a temperatura ambiente. Titar la solución después de 6 meses

Solución 2X SSC

Mezclar 100 ml de sol. 20X SSC (pH 5.3) con 850 ml de agua purificada. Aforar a volumen final de 1 L . Medir pH y ajustar a 7.0 ± 0.2 con NaOH. Almacenar a temperatura ambiente. Titar la solución después de 6 meses.

Solución de lavado 2X SSC / 0.1 % NP-40.

Mezclar 100 ml de 20X SSC (pH 5.3) con 850 ml de agua purificada, adicionar 1 ml de NP-40 y aforar a 1 L. Medir pH y ajustar a 7.0 ± 0.2 con NaOH. Almacenar a temperatura ambiente. Titar la solución después de 6 meses.

Solución de desnaturalización (70 % formamida / 2X SSC)

Mezclar 49 ml de formamida, 7 ml de 20X SSC (pH 5.3) y 14 ml de agua purificada. Medir pH con tiras indicadoras y verificar pH entre 7.0 – 8.0. Almacenar entre 2-8 °C. Tirar solución después de 7 días.

Soluciones de etanol al 70%, 85 % y 100 %

Preparar diluciones V/V con etanol puro al 100 % y agua purificada, almacenar a temperatura ambiente y tirar la soluciones después de 6 meses.

Solución de lavado con formamida (50 % formamida / 2X SSC).

Mezclar 105 ml de formamida, 21 ml de 20X SSC (pH 5.3), y 84 ml de agua purificada, medir el pH con tiras indicadoras y verificar pH entre 7.0 – 8.0. Dividir las solución en tres vasos de coplin. Almacenar a 2-8 °C. Tirar las solución después de 7 días.

RESULTADOS.

La muestra de sujetos de estudio incluyó:

85 pacientes mexicanos con diagnóstico bioquímico (ausencia de la actividad enzimática de la SE) y molecular compatible con ILX y 85 madres a las cuales se les realizó ensayo bioquímico y molecular (FISH).

En 80 pacientes (94 %) no se detectó por PCR la amplificación de los extremos 5´ y 3´ del gen STS como se observa en la **Figura 6**.

En los 5 pacientes restantes al realizar el análisis inicial de DNA por PCR, 3 de los pacientes mostraron una amplificación normal de los extremos 5´ y 3´ del gen STS y 2 de los pacientes mostraron que el gen STS estaba parcialmente deletado, en uno de los casos solo se observa amplificación del exón 1 y en el otro caso solo se observa amplificación del exón 10. (**Figura 7**).

Al determinar el punto de ruptura en estos 2 pacientes por análisis de PCR los resultados mostraron que uno de los pacientes tenía deletado el gen STS del exón 2 al exón 10 (**Figura 8**), incluyendo parte de la región flanqueadora hacia 3´ hasta DXS1133 (**Figura 9**); el otro paciente mostraba una delección del gen STS del exón 1 al exón 5 (**Figura 10 y 11**).

3 pacientes mostraron inicialmente una amplificación normal de los extremos 5´ y 3´ del gen STS. Al realizar en estos pacientes la amplificación de los exones 2 a 9 restantes, 2 mostraron una amplificación normal de todos los exones y uno de ellos presentó una delección intragénica del exón 9 (**Figura 12**).

La secuenciación de los pacientes que tuvieron amplificación normal por PCR de todos los exones, detectó en uno de ellos una mutación puntual en el exón 9 cambio de una **G** por una **A** en el aminoácido 432 en la posición 1567 (Arg432His) (**Figura 13**), y en el otro paciente se detectó una microdelección de 3 bases en el exón 7 en el aminoácido 327 en la posición 1252 (**Figura 14**).

En la **Figura 15** se resumen los datos obtenidos por PCR de los últimos 5 pacientes

Por otra parte en los 80 pacientes que presentaron la delección de los extremos 5´ y 3´ del gen STS se amplificaron las regiones flanqueadoras (32) por PCR para

identificar el tamaño de la ruptura. El análisis de PCR mostró 3 grupos de pacientes con diferentes patrones de rupturas. En el primer grupo 40 % implicó los *loci* DXS1139 y DXF22S1; el segundo grupo 31 % los *loci* DXS1139 y DXS278. Estas regiones están compuestas de secuencias CRIS-232 y G1.3 previamente reportadas. Y por último el 29 % restante (n=23), presentó rupturas no descritas anteriormente muy heterogéneas hacia ambos extremos del gen STS y en regiones sin secuencias CRIS-232. 2 pacientes presentaron la ruptura de exón 1 a exón 10; 3 de Exón 1 a DXS1131; 1 de Exón 1 a DXS1133; 1 de Exón 1 a DXS237; 1 de Exón 1 a DXF22S1; 2 de DXS1130 a DXS1131; 1 de DXS1130 a DXS237; 1 de DXS1130 a DXS1132; 3 de DXS1130 a DXF22S1; 1 de DXS1130 a DXS278; 4 de DXS1139 a DXS1131; 1 de DXS1139 a DXS1133; y 2 de DXS1139 a DXS237. El resumen de los datos se muestra en la **tabla VI**.

Por otra parte los resultados obtenidos por la técnica de FISH (hibridación *in situ*) para las 85 madres de los pacientes con ILX, mostraron que en 80 de los casos se confirma el diagnóstico de portadora de ILX, se observan 3 marcas, (1 marca fluorescente de color rojo que corresponde al gen STS y 2 marcas verdes fluorescentes que indican la posición de los centrómeros del cromosoma X, usados como controles internos en el análisis de la técnica de FISH (**Figura 16**). En 4 casos donde los pacientes con ILX mostraron una mutación puntual y deleciones parciales del gen STS, el estudio mediante FISH en las madres mostró 4 marcas como en los controles sanos (**Figura 17**). Un caso donde el niño con ILX presentaba una deleción del exón 2 a la región flanqueadora DXS1133, la madre mostró 3 marcas como una portadora, en este caso la madre solo tenía presente 17 % del gen STS (exón 1 e intrón adyacente), área no suficiente para que la sonda STS hibridara (**Figura 18**).

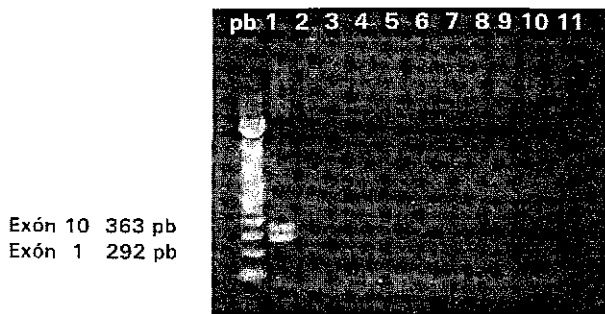


Figura 6. Análisis por PCR de exón 1 y 10 del gen STS en una muestra representativa de 9 de 80 casos con ILX. pb = marcador de 100 pb. Exón 1 (292 pb) y exón 10 (363 pb); Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3 a 11, pacientes con ILX con completa deleción del gen STS, en estos casos no se observa amplificación de los exones 1 y 10.

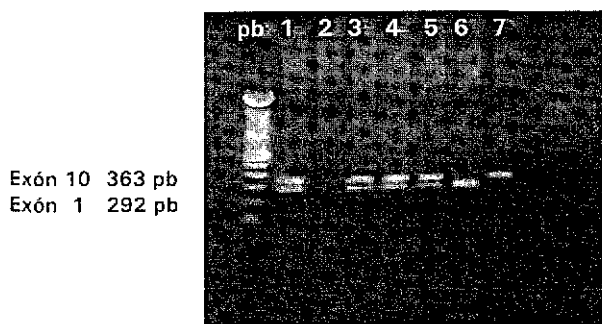


Figura 7. Análisis por PCR de exón 1 y 10 del gen STS en 5 pacientes que mostraron amplificación aparentemente normal y parcial del gen STS. pb = marcador de 100 pb. Exón 1 (292 pb) y exón 10 (363 pb); Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3, 4, y 5, pacientes con ILX con amplificación de exón 1 y 10; carril número 6, paciente con ILX, en este caso solo se observa el exón 1; carril número 7, paciente con ILX, solo se observa el exón 10;

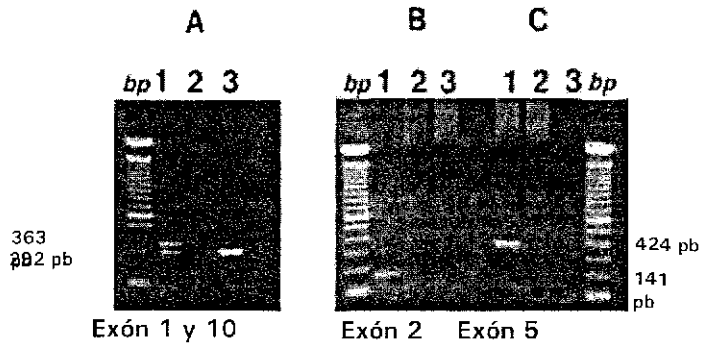


Figura 8. Análisis por PCR del gen STS en un paciente con deleción de los exones 2-10. pb = marcador de 100 pb. a) Exón 1 (292 pb) y exón 10 (363 pb); b) Exón 2 (141 pb); c) Exón 5 (424 pb). Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3, paciente con ILX con una deleción parcial que va del exón 2 al exón 10, en este caso solo se observa el exón 1

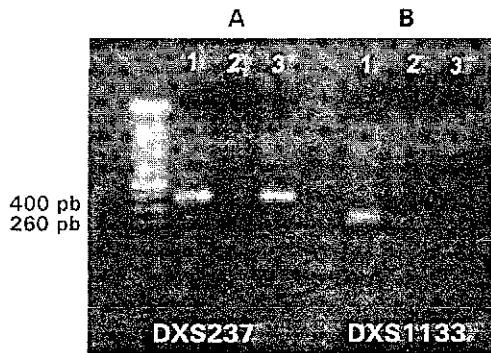


Figura 9. Análisis por PCR de las regiones flanqueadoras hacia el extremo 3' del gen STS. a) DXS237 (400 pb); b) DXS1133 (260 pb); Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3, paciente con ILX, en este caso solo se observa la región DXS237.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

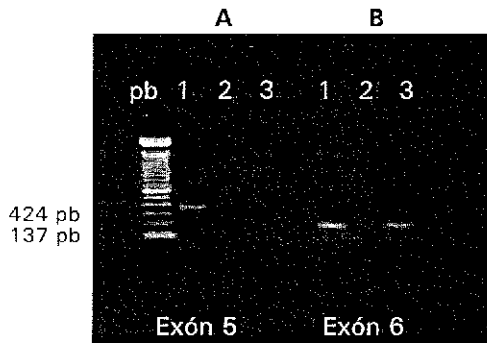


Figura 10. Análisis por PCR del gen STS, exón 5 y exón 6. pb = marcador de 100 pb. a) Exón 5 (424 pb); b) Exón 6 (137 pb). Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3, paciente con ILX, este caso presenta una deleción del exón 1 al exón 5, y únicamente se observa el exón 6.

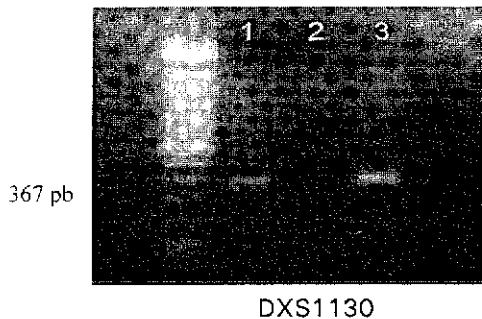


Figura 11. Análisis por PCR del paciente con pérdida exones 1-5 y región flanqueadora DXS1130 hacia 5'. pb = marcador de 100 pb. DXS1130 (367 pb). Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa deleción del gen STS; carril número 3, paciente con ILX en el cual se observa la región DXS1130.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

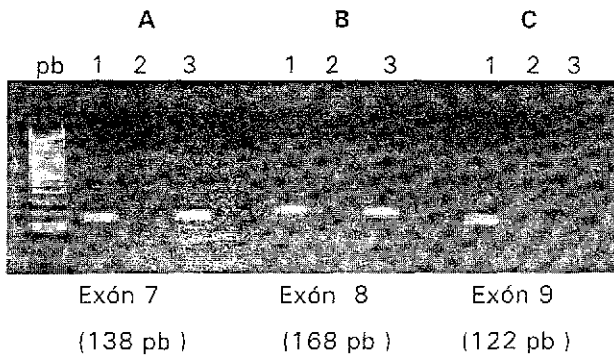


Figura 12. Análisis por PCR del gen STS en un paciente con delección del exón 9. pb = marcador de 100 pb. a) Exón 7; b) Exón 8; c) Exón 9. Carril número 1, control positivo; carril número 2, paciente con ILX con completa delección del gen STS; carril número 3, paciente con ILX, en este caso se observa en C ausencia del exón 9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(CGC)Arg432His(CAC) Posición 1567

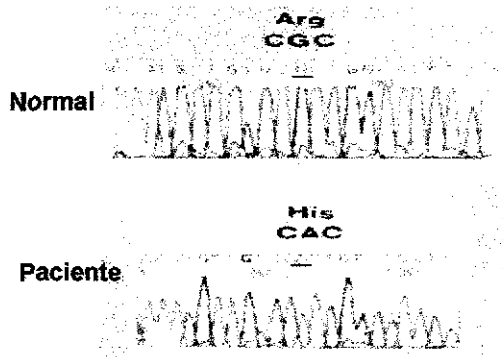


Figura 13. Electroferograma parcial del exón 9 del gen STS. Se observa la mutación puntual, cambio en 1567G>A, dando como resultado una substitución de Arginina por Histidina (Arg432His). Arriba de la línea; control normal, bajo la línea paciente con ILX.

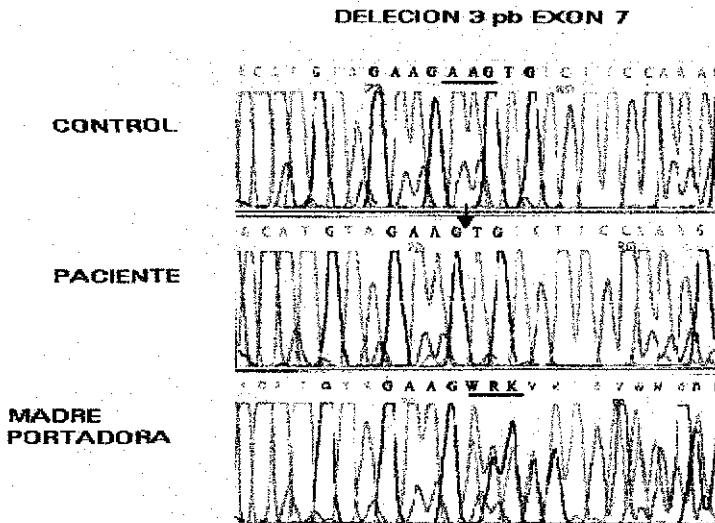


Figura 14. Electroferograma parcial del exón 7 del gen STS. Secuencia de DNA del exón 7 del gen STS en el control, en el paciente con ILX y en la madre portadora. Únicamente se muestra un fragmento pequeño que inicia en el nucleótido 1241. La pérdida de la región fue de 3 pb que se observa en el paciente con ILX que esta bajo la línea del control normal. En la madre se observa un estado de Heterozigota que inicia en el nucleótido 1252. W=A+T, R=G+A, K=T+G, Y=C+T, M=A+C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	R F	GEN STS										REGION FLANQUEADORA		
	DXS 1130	1	2	3 E	4 X	5 O	6 N	7 E	8 S	9	10	DXS 1131	DXS 1133	DXS 237
A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+ = indica amplificación de los exones del gen STS o región flanqueadora

- = indica que no hay amplificación de los exones del gen STS o región flanqueadora

Figura 15. Análisis por PCR de a) Paciente con Delección del exón 2 a DXS1133; b) Paciente con Delección del exón 1 a exón 5; c) Paciente con cambio de Arg432His en el exón 9; d) Paciente con Microdelección de 3 bases en el exón 7; e) Paciente con delección del exón 9.

En los pacientes C y D el análisis por PCR no detecta mutaciones o microdelecciones por lo que se muestran como +. Estos pacientes fueron analizados posteriormente por secuenciación automatizada

Tabla VI. Puntos de ruptura en 80 pacientes con delección total del gen STS analizados por PCR.

Pacientes	DXS 89	DXS 996	DXS 1139	DXS 1130	STS 5' EXON 1	STS 3' EXON 10	DXS 1131	DXS 1133	DXS 237	DXS 1132	DXF 22S1	DXS 278	DXS 1134	
ILX														
29 % n=23			+	-	-	-	+	+						
			+	+	-	-	+	+						
			+	+	-	-	-	+	+					
			+	+	-	-	-	+	+					
			+	+	-	-	-	-	-	+	+			
			+	+	-	-	-	-	-	-	+			
			+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
		-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
		-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	40 % n=32	+	+										+	+
	31 % n=25	+	+											+

= delección
 + = indica amplificación
 - = indica que no hay amplificación

Tabla VI. Los datos obtenidos por el análisis de PCR muestran que hay 3 grupos de pacientes con diferentes patrones de rupturas. En el primer grupo 40 % implicó los *loci* DXS1139 y DXF22S1; el segundo grupo 31 % los *loci* DXS1139 y DXS278. Estas regiones están compuestas de secuencias CRIS-232 y G1.3 previamente reportadas. Y por último el 29 % restante presentó rupturas no descritas anteriormente muy heterogéneas hacia ambos extremos del gen STS y en regiones sin secuencias CRIS-232.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

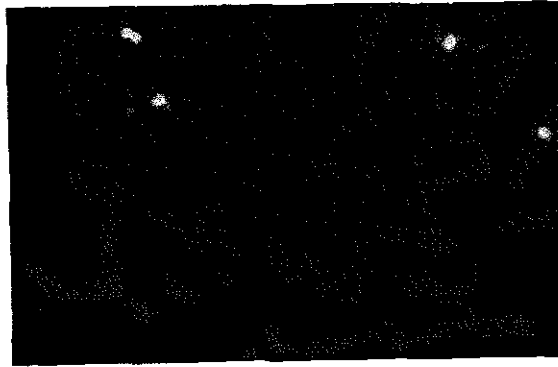


Figura 16 Análisis de la técnica de FISH (hibridación *in situ*). En 80 casos (94 %) se confirmó con esta técnica el estado de portadora de ILX. En la fotografía podemos observar uno de estos casos en el que sólo se observan 3 marcas en la metafase. La flecha blanca muestra 1 marca fluorescente de color rojo que identifica al gen STS y las 2 marcas verdes identifican los centrómeros del cromosoma X utilizados como controles internos en el análisis de la técnica de FISH.

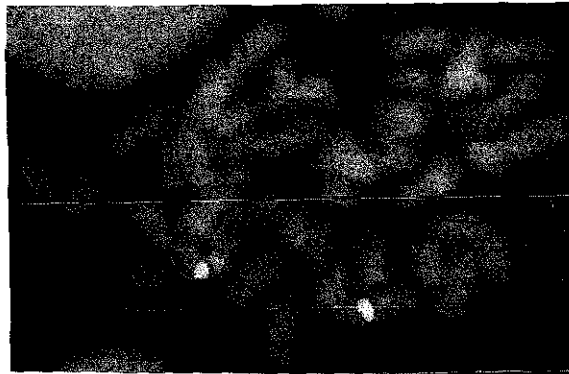


Figura 17. Análisis de la técnica de FISH (hibridación *in situ*) En 4 casos donde los pacientes con ILX mostraron una mutación puntual, una microdelección de 3 bases y 2 defecciones parciales del gen STS, la técnica de FISH mostró 4 marcas en las metafases. En la fotografía podemos observar uno de los casos. La flecha blanca muestra 2 marcas de color fluorescentes rojo que indica la presencia del gen STS y las 2 marcas verdes que se observan indican la presencia de los centrómeros del X utilizados como controles internos en el análisis de la técnica de FISH.

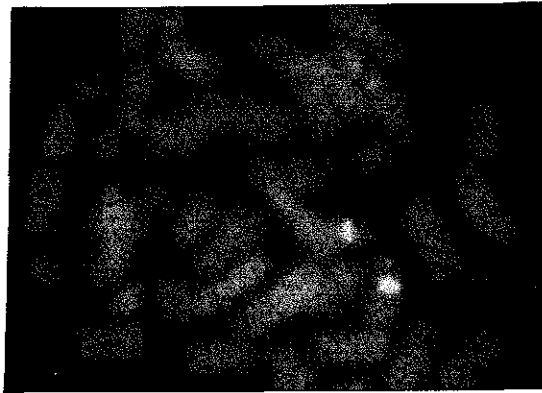


Figura 18 Análisis de la técnica de FISH (hibridación *in situ*) Delección parcial del gen STS del exón 2 a la región DXS1133. La madre de este caso presentaba solo el 17 % del gen STS (exón 1 e intrón adyacente). La técnica de FISH mostró en esta portadora 3 marcas, la flecha blanca señala una marca fluorescente de color rojo que indica la presencia del gen STS en el cromosoma X y las marcas fluorescentes de color verde indican la presencia de los centrómeros de los cromosomas X, utilizados como controles internos en el análisis de la técnica de FISH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis cuya característica fundamental es la retención o hipertrofia del estrato córneo. De acuerdo a criterios clínicos, moleculares y patrón de herencia, las ictiosis se clasifican actualmente en: vulgar (IV), ligada al X (ILX), bulosa, lamelar y eritrodermia ictiosiforme congénita no bulosa (2, 6, 7).

Alrededor de 90 % de los pacientes con ILX presentan delección total del gen STS y regiones flanqueadoras y el 10 % restante presenta delecciones parciales o mutaciones puntuales del gen STS (24, 26-29, 46).

Estudios sobre las delecciones totales del gen STS sugieren que estos rompimientos se deben a la existencia de las familias de secuencias repetidas en número bajo de copias G1.3 y CRI-S232 (31-33, 43-46) Estas se encuentran intercaladas y distribuidas en la región Xp22.3 y hacia ambos lados del gen STS (31-33, 43-46). La clona CRI-S232 del genoma humano se encuentra en el cromosoma X, es altamente polimórfica y también se ha identificado en el cromosoma Y, aunque en menor proporción. La sonda CRI-S232 hibrida en el cromosoma X en la región flanqueadora 5' del gen STS con los *loci* DXS1139 (CRI-S232A2) y en la región flanqueadora 3' con DXS237 (GMGX9), DXF22S1 (G1.3), DXS278 (CRI-S232B2), *dic56* (DXS143) , 782 (DXS85) y pD2 (DXS43). En el cromosoma Y hibrida en la región pseudoautosómica con los *loci* pDP230 (DXYS20) y pDP411a (DXYS28) 4E(31, 32, 46).

CRI-S232 presenta una secuencia de 7 kb y se organiza en 4 regiones designadas como a, b, c y d; la secuenciación de b y c revela que éstas contienen VNTRs, designados como elementos RU2 y RU1 respectivamente, con altos contenidos de GC e hipervariables en los *loci* del cromosoma X y con menos variabilidad en los *loci* del cromosoma Y. La secuenciación de las regiones a y d muestra secuencias estables.

El elemento RU1 tiene 30 pb repetidas en el cromosoma X y con 60 % de GC, además muestra una variación mínima entre los individuos. El elemento RU2 es hipervariable en

el *locus* CRI-S232 del cromosoma X, presenta un rango de 0.6 - 23 kb entre individuos y contiene 65 % de GC (46).

Reportes en la literatura indican que las regiones más frecuentemente implicadas en las deleciones totales del gen STS en pacientes con ILX se localizan entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 (28, 34, 36) y entre las regiones DXS1139 y DXS278 (31, 32). Se ha sugerido que la ruptura que se lleva a cabo en estas regiones es debida a la recombinación entre secuencias CRI-S232 en la región DXS1139 y entre las secuencias G1.3 en DXF22S1. Por otra parte, en las rupturas que se llevan a cabo entre DXS1139 y en DXS278 también se encuentran presentes secuencias CRI-S232. Estudios realizados en Israel y Japón indican que la deleción entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 se presenta en más de 80 % de los casos (28, 34, 36) No obstante Pauline y colaboradores, informa que 88 % de sus pacientes presenta la deleción entre la región DXS1139 y DXS278 (31, 32). En el presente trabajo se analizaron 80 casos con deleción total del gen STS. Es importante mencionar que en nuestro estudio se presentaron ambos tipos de deleciones previamente reportadas (28, 31, 32, 34, 36). DXS1139 y DXF22S1 se presentó en 32 pacientes (40 %) y DXS1139 y DXS278 en 25 pacientes (31 %). Ambos tipos de deleción muestran la misma región (DXS1139) hacia el extremo 5', sin embargo hacia el extremo 3' difieren en la posición de la ruptura por 141 kb.

Se ha postulado que estas deleciones son causadas por recombinación homóloga. Además se ha sugerido que la recombinación entre las secuencias CRI-S232 ocurre cuando presentan la misma orientación y no cuando presentan secuencias repetidas invertidas (45). Es posible que la recombinación sea promovida por secuencias VNTR, especialmente por los elementos RU2, que tienen un polimorfismo que varía drásticamente en el número de copias en un rango de 6 a 800 (32, 46).

Los 23 pacientes restantes (29 %) no presentan las rupturas previamente mencionadas, 2 casos rompen en DXS1139 y DXS237 donde se encuentran presentes

La segunda parte de nuestro estudio consistió en determinar la utilidad de la técnica de FISH (hibridación *in situ*) dependiendo de la magnitud de la deleción observada en el gen STS en pacientes con ILX. Esta técnica es una herramienta muy útil en la detección de portadoras de ILX, considerando que éstas presentan un alelo normal y no pueden ser identificadas por PCR (28).

La técnica de FISH aplicada a las 85 madres de los pacientes con ILX mostraron en 80 casos (94 %) con deleción del gen STS, 3 marcas fluorescentes en las metafases, de éstas marcas, 2 fueron de color verde que identifican los centrómeros de los cromosomas X (usadas como control interno) y la otra de color rojo en la región pseudoautosómica del cromosoma X, identifica al gen STS. Así se confirmó el diagnóstico de portadoras de ILX (Figura 14).

Cuando se realizó el análisis por PCR y secuenciación del gen STS a los pacientes con ILX, se encontró que 5 casos presentaban alteraciones en el gen, una mutación puntual en el exón 9, una microdeleción de 3 bases en el exón 7 y 3 deleciones parciales. El análisis por la técnica de FISH en las madres de estos pacientes demostró en 4 casos que las metafases presentaban 4 marcas fluorescentes como en personas normales 2 de estas marcas verdes identifican los centrómeros de los cromosomas X (usadas como control interno) y 2 marcas rojas, en la región pseudoautosómica del cromosoma X identifican el gen STS.

Sólo en un caso donde el análisis por PCR mostró una deleción de 83 % del gen STS (del exón 2 a la región DXS1133), la técnica de FISH solo reveló 3 marcas en las metafases, indicando con ello que se trataba de una portadora. Los resultados obtenidos en este último caso indican que con 17 % del gen presente (exón 1 e intrón adyacente), es suficiente para determinar por FISH un estado de portadora tal como ocurre en deleciones totales

Considerando el porcentaje de mutaciones puntuales, deleciones parciales y totales del gen STS y de acuerdo a la literatura 90 % de los casos corresponden a deleciones totales del gen STS y la técnica de FISH es útil para diagnosticar un estado de portadora de ILX. En cuanto al 10% de los casos donde se presentan deleciones parciales y mutaciones puntuales del gen STS, los resultados por FISH serían falsos negativos. Para estos casos la combinación de técnicas de biología molecular tales como FISH, PCR y secuenciación permiten ofrecer un diagnóstico claro y preciso

CONCLUSIONES.

80 pacientes presentaron delección completa del gen STS.

40 % (n=32) de los pacientes tuvieron ruptura entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 y 31 % (n=25) entre las regiones DXS1139 y DXS278, ambos tipos de rupturas han sido previamente reportadas en pacientes caucásicos, japoneses e israelitas. Se postula que estas rupturas se llevan acabo por recombinación homóloga debido a la presencia de secuencias CRI-S232 y G1.3 que se encuentran intercaladas entre estas regiones.

El resto de los pacientes (n=23), 29 % presento rupturas heterogéneas no descritas anteriormente que no implican secuencias homólogas, probablemente en estas regiones existan otros mecanismos diferentes a la recombinación homóloga capaces de producir este tipo de rupturas.

El análisis por FISH (hibridación *in situ*) reveló que en 94 % de los casos con delección total del gen STS se confirma el diagnóstico de portadora de ILX y que esta técnica puede ser aplicada cuando existan al menos 83% de pérdida del gen STS, excluyendo su utilidad en delecciones de menor extensión al 83 % ; en delecciones parciales y en mutaciones puntuales.

REFERENCIAS.

- 1.- Macsai M , Doshi H. "Clinical pathologic correlation of superficial corneal opacities in X-linked ichthyosis". American Journal of ophtalmology 118:477-484, october, 1991.
- 2.- Shayder T Ott F, et al . "All about ichthyosis" Pediatric Clinics of North America. Vol 38: 835, No. 4, August 1991.
- 3.- Greither A. Dermatologica (basel) 1964; 128 : 464
- 4.- Touraine A. Ann Derm Syph (Paris) 1958; 85:257.
- 5.- Wells RS, Kerr CB. Arch Derm 1965; 92:1
- 6.- Willian R. On cutaneous diseases. Johnson, London 1808.
- 7.- Frost P. Ichthyosiform dermatoses. J Invest Dermat 1973; 60: 541.
- 8.- Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. Br Med J 1966;1:947-950.
- 9.- Lykkesfeldt G, Nielsen MD, Lykkesfeldt a. Placental steroid sulfatase deficiency: biochemical diagnosis and clinical review. Obstet Gynecol 1984;64:49-54.
- 10.- Shapiro LJ, Weiss R. X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency Lancet 1978;14:70-72.
- 11.- France JT, Liggins GC. Placental sulfatase deficiency. J Clin Endocr 1969; 29:138.
- 12.- Bergner EA, Shapiro LJ. Metabolism of ³H-Dehydroepiandrosterone sulphate by subjects with steroid sulphate deficiency J Inherit Metab Dis 11: 403, 1988.
- 13.- Rose FA. The mammalian sulphatases and placental sulfatase deficiency in man. J Inherit Metab Dis 5 : 145, 1982.
- 14.- Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y. Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver : Characterization of estrone sulfate. Arch Biochem Biophys 174 : 199, 1976.
- 15.- Dibbelt L, Kuss E. Human Placental steryl sulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. Biol Chem Hoppe-Seyler 372: 173, 1991.

- 16.- Puca AA, Zollo M, Repetto M, et al. Identification by a Shotgun sequencing, genomic organization, and functional analysis of a fourth arylsulfatase gene (ARSF) from the Xp22.3 region. *Genomics* 42:192, 1997.
- 17.- Franco B, Meroni G, et al. A cluster of sulfatase gene on Xp22.3; mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embriopathy. *Cell* 81: 15, 1995.
- 18.- Conary J, Nauerth A, Burns G, Hasilik A, Figura K. Steroid sulfatase. *Eur J Biochem* 1986;158:71-6.
- 19.- Hobkirk R. Steroid sulfotranferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol* 1985;63:1127-44.
- 20.- Chang PL, Mueller OT, Lafrenie RM, et al. The human arylsulfatase-C isoenzymes : two distinct genes that escape from X inactivation. *Am J Human Genet* 1990; 46: 729.
- 21.- Shankaran R, Ameen M, et al. Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta. *Biochim Biophys Acta* 1078 : 251, 1991.
- 22.- Munroe DG, Chang PL. Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am J Hum Genet* 40 : 102, 1987.
- 23.- Daniel WL, Chang PL. Comparison of aryl sulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver. *Enzyme* 43 : 212, 1990.
- 24.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell* 1987;49:443-54.
- 25.- 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
- 26.- 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; 86:8447.

- 27 - Cuevas-Covarrubias S, Kofman S, Maya G, Díaz Zagoya JC, Orozco E. X-linked ictiosis in México : high frequency of deletions in the steroid sulfatase encoding gene. *Am J Med Genet* 1997; 72:415.
- 28 - Aviram-Goldring A, et al. 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. *International Journal of Dermatology* 2000, **39**, 182-187.
- 29.- Valdes-Flores M, Kofman-Alfaro SH, Jiménez Vaca AL, and Cuevas-Covarrubias SA. A novel Partial Deletion of Exons 2-10 of the STS Gene in Recessive X-Linked Ichthyosis. *The Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 114 No. 3, March 2000.
- 30.- Ballabio A, Carrozzo R, Parenti G et al. Molecular Heterogeneity of steroid sulfatase deficiency : a multicenter study on 57 unrelated patients, at DNA and protein levels. *Genomics* 1989 : 4 : 36-40.
- 31 - Knowlton R.G, Nelson C.A, Brown V.A, et al. An extremely polymorphic locus on the short arm of the human X chromosome with homology to the long arm of the Y chromosome. *Nucleic Acids Research*. Volume 17. Number 1. 423-437 (1989).
- 32.- Yen PH , Xiao-Miao L, Siao-Ping T, et al. Frequent Deletions of the Human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*, Vol 61, 603-610, May 18, 1990.
- 33.- 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
- 34.- Schaefer L, Ferrero GB, et al. A high resolution deletion map of human chromosome Xp22. *Nature Genetics* .volume 4 july 1993. 272-279
- 35.- Yen PH, Tsai S-P, Wenger SL et al. X/Y translocations resulting from recombination between homologous sequences on Xp and Yq. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 : 88 : 8944-8

- 36.- Saeki H., Kuwata S, et al. Deletion pattern of the steroid sulphatase gene in Japanese patients with X-linked ichthyosis. *British Journal of Dermatology* 1998;139:96-98.
- 37.- 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.
- 38.- Basler E, Grompe M, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutations in the steroid sulfatase deficiency. *Am J Hum Genet* 1990; 47:228.
- 39.- 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.
- 40.- Alperin E. S and Shapiro L. J. Characterization of Point Mutations in patients with X-linked Ichthyosis. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272 . No. 33 . August 15, pp 20756-20763, (1997).
- 41 - Oyama Noritaka, Satoh Masataka, et al. Novel point mutations in the steroid sulfatase gene in patients with X-linked Ichthyosis: Transfection analysis using the mutated genes. *The Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 114, No. 6, June 2000. pp 1195-1199.
- 42.- M Valdes-Flores, AL Jiménez-Vaca, SH Kofman-Alfaro and SA Cuevas-Covarrubias . *Acta Derm Venereol* 2001; 81 : 54-78.
- 43.- Puca AA, Zollo M, Repetto M. Identification by shotgun sequencing, genomic organization and functional análisis of a fourth arylsulfatase gene (ARSF) from the Xp22.3 region. *Genomic* 1997; 42: 192.
- 44.- 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.
- 45.- Yen PH, Li X-M, Tsai S-P, Jhonson C, et al. Frequent deletions of the human X-chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell* 1990; 61 : 603.

- 46.- Xiao-Miao L, Pauline H. Y. and Shapiro L.J. 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 Acids Research*, Vol. 20, No.5 1117-1122. (1992).
- 47.- Cuevas-Covarrubias S. A, Juárez-Oropeza M A, Miranda-Zamora R, Díaz Zagoya J.C Comparative analysis of human steroid sulfatase activity in prepuberal and postpuberal males and females *Biochem Mol Biol Inter* 1993;30:691-5.
- 48 - Epstein EH, Leventhal ME. Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermis and diagnosis of recessive X-linked ichthyosis *J Clin Invest* 1981; 67:1257
- 49.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989 *Molecular cloning* 2a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor, Laboratory press
- 50.- Buffone, G.G and Darlington, G J (1985) Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol *Clin Chem.* 31:164-165
- 51 - Kempster, B and K. Grossbadem. (1992). Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 8:2
- 52.- Ballabio A, Ranier JE, Chamberlain JS, Zollo M, Caskey CT (1990) Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. *Hum Genet* 84:571-2.
- 53.- Sugawara T, Shimizu H, et al. PCR Diagnosis of X-linked Ichthyosis: Identification of a Novel mutation (E560P) of the Steroid Sulfatase Gene. *Human Mutation*, 20 December 1999. 1-7
- 54 - Verma RS, Babu A. *Human Chromosomes: principles and techniques*. 2nd ed Mc Graw-Hill, Inc, 1994
- 55.- Mitchel BS, Dhimi D and Schumscher V. *In situ Hybridization: a review of methodologies and applications in the biomedical sciences*. *Med Lab Sci* 1992; 49:107-118
- 56.- Lichter P, Boyle A, Cremer. Analysis of gene and chromosome by non isotopic *in situ hybridization* *Genet Anal Techn* 1991; 8:24-35.
- 57 - *From Methods in Molecular Biology, Vol 33 In situ Hybridization Protocols* K H A Choo Copyright,. Humana Press Inc Totowa, NJ 1994.

- 58 - 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 LI.84 Hum Genet.1986;74(4):346-352.
- 59.- Pinkel D, Straume T. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83 (9):2934-8.
- 60 - Methods in Molecular Biology, Protocols for Nucleic Acid Analysis by No radioactive Probes, Isacc Copyright 1994 Human Press Inc Totowa, NJ.
- 61 - Luke S, Shepelsky M. FISH recent advances and diagnostic aspects Cell Vision 1998; 5 (1): 49-53