



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

**IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN PARENTAL DEL CROMOSOMA X
AFECTADO EN PACIENTES CON ICTIOSIS RECESIVA LIGADA AL X**

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO GENETISTA
PRESENTA
JAIME TORAL LÓPEZ

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

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE.

PÁGINA

RESUMEN.	3
I.- MARCO TEÓRICO.	4
II.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	10
III.- OBJETIVO.	10
IV.- HIPÓTESIS.	10
V.- TIPO DE ESTUDIO.....	11
VI.- MATERIAL Y REACTIVOS	12
VII.- PROCEDIMIENTO.	16
VIII.-RESULTADOS.	21
IX.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	32
X.-BIBLIOGRAFÍA.	35

RESUMEN.

La ictiosis ligada al cromosoma X (ILX) es una genodermatosis con una frecuencia de 1:2000-6000 varones. Se caracteriza clínicamente por presentar escamas oscuras, regulares y adherentes en la piel, manifestándose al nacimiento o 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), codificada por el gen *STS*. La mutación más común en la ILX es la delección total del gen (85-90%), el resto corresponde a mutaciones puntuales o deleciones parciales. Estudios en individuos con presencia de deleciones intersticiales en el brazo corto del cromosoma X, especialmente del gen *STS*, sugieren que las rupturas o deleciones se deben a 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 en ambos lados del gen *STS*. El objetivo del presente trabajo es identificar el origen parental del cromosoma X afectado en la ILX para descartar o apoyar el mecanismo de recombinación homóloga desigual como causa de la pérdida del gen *STS* en este padecimiento. En el presente trabajo se estudiaron 5 portadoras obligadas de ILX, que correspondían a mutaciones de novo y cuyo defecto genético fue la pérdida total del gen *STS*. En todas se llevó a cabo el ensayo bioquímico de la SE en leucocitos y FISH del gen *STS*. Se delimitó el tamaño de la delección mediante PCR de los exones 1 y 10 del gen y secuencias flanqueadoras. El análisis de segregación para la identificación del cromosoma X afectado se realizó mediante Gene Scan con la utilización de 7 marcadores polimórficos microsatélites. Con los resultados en 1 de las 5 familias comprobamos que el origen del cromosoma X afectado es de origen paterno y en otra se sugiere fuertemente este mismo origen. En las 3 familias restantes fue insuficiente el número de marcadores microsatélites para poder identificar el origen del cromosoma X afectado. Con estos datos afirmamos que la recombinación homóloga desigual en la meiosis materna no es el único mecanismo en la génesis de las deleciones del gen *STS* en la ILX.

I. MARCO TEORICO

LA ICTIOSIS

El término ictiosis ha sido empleado por más de 2000 años y proviene de la raíz griega 'ichthys' (ictios) que significa pez. Los hindúes y chinos en el siglo XIX se referían a la enfermedad como una "afección de la piel de serpiente o escamas de pescado" y en la época del médico árabe Avicenna como "*albarras nigra*". Alibert consideraba que era causada por vivir en áreas cercanas a corrientes de agua estancada, al 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, Cockayne fue el primero en usar la clasificación genética siendo reclasificada por Greither en 1964, así como por Touraine en 1958. Wells y Kerr en 1965 estudiando las manifestaciones clínicas y genealógicas, pudieron distinguir a la ILX como una enfermedad diferente a las otras ictiosis (1-3).

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 (4).

La ILX se ha observado en diferentes grupos étnicos y afecta a 1 de cada 2,000-6,000 varones, en nuestro país no se conoce la ocurrencia 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 (5-9).

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 o bulosa. Siendo la IV y la ILX las más frecuentes. Existen además otras condiciones ictiosiformes genéticamente indefinidas (10-11). En el cuadro 1 se muestran las principales características de las ictiosis (2).

Tipo de ictiosis	Forma de herencia	Incidencia	Características de las escamas	Defecto bioquímico
Vulgar	AD	1:250 rnv	Finas, irregulares y adherentes.	Desconocidos
Ligada al cromosoma X	LX	1.2000 a 6000 varones	Grandes, oscuras, regulares y adherentes	Deficiencia de SE, aumento de SC y LDL
Lamelar	AD AR	1:300,000 rnv	Grandes, gruesas, bordes elevados	Esterol libre y ceramida.
Bulosa	AD	1:300000 rnv	Gruesas, verrugosas y oscuras.	Desconocido
Eritrodermia ictiosiforme congénita	AR	1:300000 rnv	Finas.	Desconocido.

Cuadro 1: Características clínicas de las ictiosis.

AD: Autosómica dominante, AR: Autosómica recesiva, LX: ligada al cromosoma X. SE: Sulfatasa de Esteroides, SC: Sulfato de colesterol, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, rnv: recién nacido vivo. Fuente: Modificación de Shwayder y Ott (3).

LA SULFATASA DE ESTEROIDES (SE)

France y Liggins en 1969 aportaron la primera evidencia de alteraciones en la actividad de la SE al demostrar la disminución en la síntesis de estrógenos en mujeres portadoras de la deficiencia placentaria 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 hijos (12). 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 (12-13).

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⁽¹³⁻¹⁸⁾.

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⁽¹⁷⁻²¹⁾.

La SE inmadura está compuesto por 514 aminoácidos, de los cuales los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postraduccionalmente para dar origen a la enzima madura de 492 aminoácidos. 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 mas pequeño un dímero de 126 kDa⁽²¹⁻²²⁾.

EL GEN DE LA SULFATASA DE ESTEROIDES (STS).

El gen *STS* codifica para la SE y está ubicado en Xp22.3. Se extiende sobre una región de 146 kb muy cerca de la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones de tamaño variable y dos regiones que no se transcriben (UTR), una en el extremo 5' de por lo menos 206 pb y otra en el extremo 3' de 668 pb intercaladas por una secuencia de marco abierto de lectura (ORF) de 1542 pb. Tiene además una señal de poliadenilación (AATAAA) de 13 pb antes del comienzo de la cola de poli-A⁽²³⁻²⁶⁾ (Fig. 1).

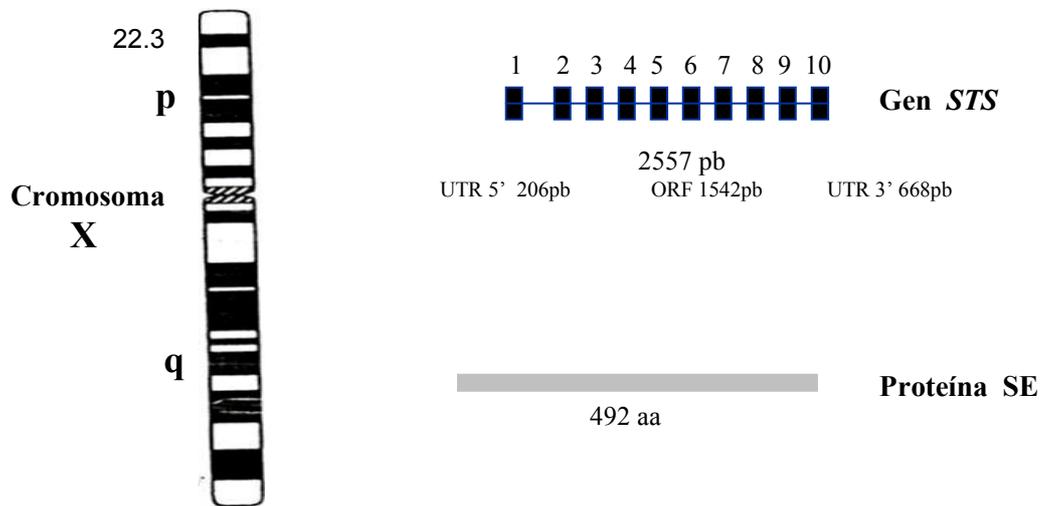


Figura 1. Representación esquemática del gen STS, su ubicación en Xp22.3, marco abierto de lectura de 1683pb y proteína SE 561 aminoácidos.

El gen *STS* tiene un homólogo no funcional (pseudogén) en el brazo largo del cromosoma Y (Yq11.2) con 90% de homología. Las diferencias están dadas por sustituciones de pares de bases, adiciones y deleciones que producen en el pseudogén la incapacidad de originar un producto proteico funcional. (Figura 2)⁽²⁶⁻²⁷⁾.

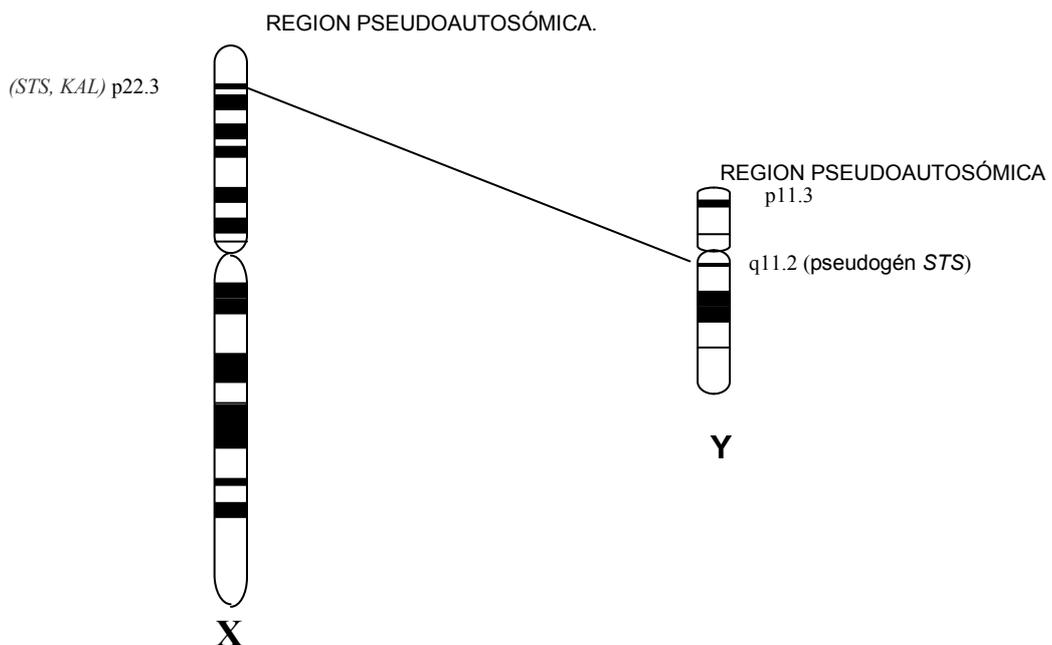


Figura 2.- Localización del gen y pseudogén *STS* en el cromosoma X e Y.

La mayoría de los pacientes con ILX (90%), presentan pérdida total del gen STS como causa de la enfermedad, el 10% de los casos se han presentado deleciones intragénicas y mutaciones puntuales. Es importante señalar que 5% de los pacientes además del gen STS pierden genes adyacentes, lo que condiciona la presencia de fenotipos más complejos que se conocen como aneusomía segmental. Estos pueden incluir, síndrome de Kallmann, retardo mental y condrodisplasia punctata principalmente (28-38).

SECUENCIAS CRI-S232 Y G1.3

Estudios sobre deleciones intersticiales en el brazo corto del cromosoma X, especialmente del gen STS, sugieren que las rupturas se deben a la presencia 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 en ambos lados del gen STS. Se ha postulado que la presencia de estas secuencias condiciona posiblemente un apareamiento anormal durante la meiosis por la recombinación homóloga desigual entre estas unidades de repetición, lo que podría explicar la alta frecuencia de deleciones intersticiales en esta región génica (39-40). En un estudio realizado con 80 pacientes mexicanos con ILX y pérdida completa del gen STS, 40% (n=32) presentaron ruptura entre las regiones DXS1139 y DXF22S1 y 31% (n=25) entre las regiones DXS1139 y DXS 278, ambas rupturas previamente reportadas en caucásicos, japoneses e israelitas (44-45). Se postuló que estas rupturas se llevaron a cabo por recombinación homóloga desigual debido a las secuencias CRI-S232 y G1.3 que se encuentran intercaladas entre estas regiones (40-46).

Sin embargo, el resto de los pacientes (n=23), 29% presentó rupturas heterogéneas no descritas anteriormente que no implicaban secuencias homólogas, los autores proponen que probablemente existan otros mecanismos, diferentes a la recombinación homóloga desigual, capaces de producir la pérdida del gen STS (46).

RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

La recombinación meiótica media dos procesos esenciales: el apareamiento estable de cromosomas homólogos durante las etapas de leptoteno y zigoteno y la conexión de los homólogos por quiasmas desde la etapa de diploteno hasta el inicio de la anafase I. Este mecanismo inicia por rupturas programadas de doble cadena del DNA

(DSB). Más de 250 DSB son formadas por célula meiótica, sólo un grupo produce entrecruzamientos que conduce a la formación de quiasmas, mientras muchos eventos de recombinación no producen entrecruzamientos, si no eventos sin intercambio de brazos cromosómicos. A lo largo de las vías de entrecruzamiento, los dos extremos de una DSB interactúan secuencialmente con un homólogo a través de dos moléculas intermediarias de unión: invasión de extremos simples (IES) y uniones dobles de *Holliday* (UDH). Las UDH son subsecuentemente resueltas para dar principalmente productos entrecruzados. Los eventos que conducen a no-entrecruzamiento son menos claros, aunque las evidencias favorecen el mecanismo de alineamiento de la cadena dependiente de síntesis. De acuerdo a este modelo un extremo DSB invade un homólogo y ceba la síntesis del DNA, la cadena naciente es entonces desplazada y se aparea con la secuencia complementaria sobre la segunda DSB para sellar su ruptura (47-49).

MARCADORES MICROSATELITES

Los marcadores microsatélites también llamados marcadores de repetidos cortos en tándem (STR), son *loci* de DNA polimórfico que contienen secuencias de nucleótidos repetidos. La unidad de repetición puede ser de 2 a 7 nucleótidos en longitud, se presentan en bloques en tándem de hasta 50 repeticiones, distribuido de forma dispersa por el genoma (53-55).

El número de unidades repetidas en un *locus* microsatélite puede cambiar, así un *locus* de diferente tamaño es posible. Los *loci* microsatélite se encuentran a través del genoma de muchos organismos y por lo tanto han sido usados como marcadores para establecer grupos de ligamiento en cruces y para mapear posiciones cromosómicas de mutaciones identificadas genéticamente.

Los *loci* microsatélite altamente polimórficos son muy útiles para identificar individuos en una población y para determinar si dos individuos están o no relacionados. Su distribución en el genoma los hace muy buenos marcadores para construir mapas genéticos (53).

II.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que la presencia de secuencias intercaladas cortas ubicadas en el brazo corto del cromosoma X favorecen una recombinación homóloga desigual y por tanto la pérdida del gen *STS*.

Con base en estos antecedentes el planteamiento de nuestro problema estaría dirigido a conocer cuál es el origen parental del cromosoma X afectado con la pérdida del gen *STS* para descartar o no como único mecanismo la recombinación homóloga desigual en la génesis de la ILX.

III.- OBJETIVO GENERAL

Identificar el origen parental del cromosoma X afectado en la ictiosis recesiva ligada al X

IV.- HIPÓTESIS.

Si el evento de recombinación homóloga desigual es el único mecanismo que produce la pérdida del gen *STS* en las portadoras de ILX entonces, el cromosoma X afectado en estas pacientes será siempre de origen materno.

V.- TIPO DE ESTUDIO

DISEÑO DEL ESTUDIO: Se trata de una investigación, descriptiva, transversal.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Familias con mutaciones de novo en la ILX que nos permitan la identificación del origen parental del X afectado

Familias que acepten participar en el estudio con su consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Que no acepten participar en el estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

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

VARIABLE INDEPENDIENTE: Pacientes que presenten mutaciones de novo (con base en estudios previos las portadoras presentan la mutación *de novo*).

VARIABLE DEPENDIENTE: Identificación del origen parental del cromosoma X afectado.

VI.-MATERIAL Y REACTIVOS.

INSTRUMENTOS

- Secuenciador ABI-310
- Cámara para electroforesis
- 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
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro (Beckman)
- Microcentrifuga refrigerada
- Termómetros
- Microscopio de epi-fluorescencia BX60(OLYMPUS)

CRISTALERIA

- Probetas volumétricas 100ml.
- Pipetas graduadas 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo 15X100 mm
- Vasos de precipitado 25, 50 y 100 mL
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos de polipropileno 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 de polipropileno 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 H₃. (NIW marca)
- Control DNA CEPH
- Marcador de peso GS-400 HD ROX
- Linkage Mapping Set Version 2, panel 28 ABI- PRISM
- POP-4
- Sonda LSI del gen STS con control CEPX (Vysis)
- Amortiguador
- Cemento de goma (marca)
- Kit para PCR
- Oligonucleotidos, DNTP's
- Formamida ultra pura
- Etanol 100% (MERCK grado analítico)
- Benceno (MERCK grado analítico)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Metanol (MERCK)
- Líquido de centelleo
- 4,6 Diamino-2-fenil-indol
- 20XSSC

SOLUCIONES

- NH₄Cl 0.85%.
- TRIS 0.014M -pH 7.0
- KCl 0.075M

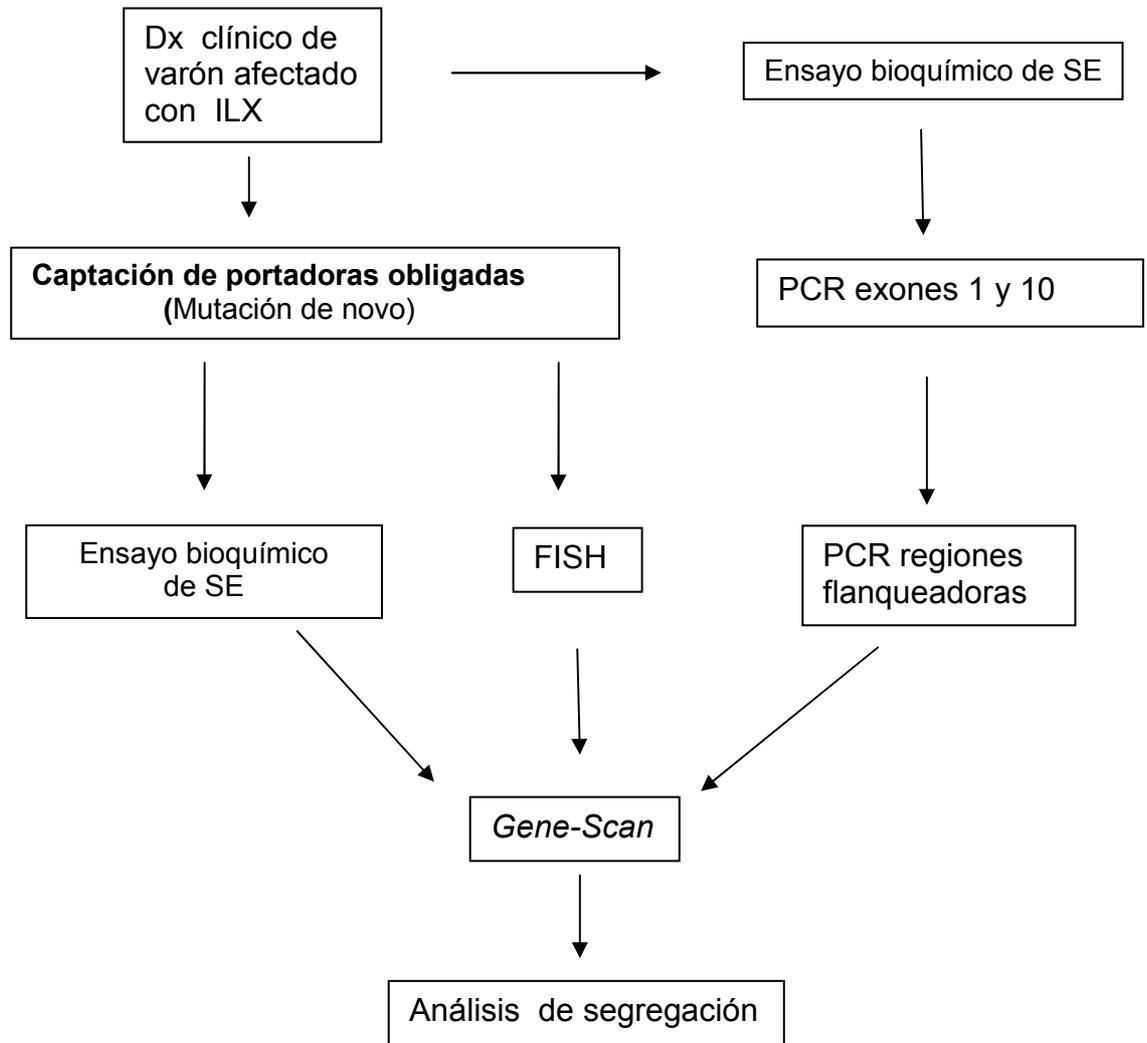
- Fijador metanol /ác. acético 3:1
- Solución 2X SSC
- Ác. Etilendiaminotetrácetico sal disódica EDTA
- Solución de Formamida al 70%
- Solución de NP-40 0.1 y 0.4%
- Solución de 2XSSC con NP-40
- Solución de Bradford

MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre venosa periférica obtenida con EDTA como anticoagulante (para ensayo bioquímico y extracción de DNA)
- Raspado de mucosa oral

VII.- PROCEDIMIENTO

DIAGRAMA DE FLUJO



A). DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA

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

- 1.- 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 ante cubitales con jeringa de plástico estéril, empleando EDTA como anticoagulante.
- 2.- 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.
- 3.- 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 $10\mu\text{l}$ de Sulfato de Dehidroepiandrosterona ($\text{DHEAS-}^3\text{H}$), para un volumen de $200\mu\text{l}$ de muestra, se homogeniza la enzima y el sustrato y se procede a incubar 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 $600\mu\text{l}$, 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.

B). 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' del gen STS y regiones flanqueadoras con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la siguiente mezcla de reacción:

Agua desionizada, Buffer 1X dNTP's con una concentración de 0.6 mM de cada uno, 0.5 mM de cada *primer*, 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 oligonucleótidos empleados en la amplificación fue la siguiente:

Exón 1

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

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

Exón 10

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

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

Para la amplificación de regiones flanqueadoras se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 5' DXS996, DXS1139, DXS1130 y para la región 3' DXS237, DXF22S1, DXS278 (cuadro 2).

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.

C). HIBRIDACIÓN “IN SITU” CON FLUORESCENCIA (FISH) EN RASPADO DE MUCOSA BUCAL

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 está marcada con el fluorocromo espectro naranja e incluye 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 jarras *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 aforo con H₂O a un volumen final de 10 µl.

3) Hibridación.

Se aplicaron 10 µl de la mezcla de hibridación por cada 25 x 25 mm de área en las preparaciones cromosómicas. Posteriormente, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con cemento de goma (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 0.4XSSC con NP-40 y posteriormente 0.1XSSC. 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 el microscopio de epi-fluorescencia (OLYMPUS) con aumento a 100X. 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.

D). GEN-SCAN PROCEDIMIENTO

La cuantificación del DNA se llevó a cabo por espectrofotometría y la determinación de la calidad del mismo fue mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Para la estandarización de la PCR se utilizaron 7 marcadores microsatélites marcados con fluorescencia del panel 28 LINKAGE MAPPING V.2 aplicados en todos los miembros de las familias estudiadas (cuadro 2).

MARCADOR	FLUORESCENCIA	RANGO EN PB	LOCUS
DXS1060	NED	243-263	Xp22.3
DXS987	FAM	206-224	Xp22.2
DXS1214	HEX	279-293	Xp21
DXS1226	NED (NEGRO)	284-306	Xp21
DXS993	FAM	265-289	Xp11.3-11.4
DXS991	NED	316-344	Xp11.1
DXS990	FAM	122-138	Xq21

Cuadro 2. Características de los marcadores microsatélites(CA) indicando el rango y ubicación del marcador.

En el cuadro 3 se muestra la mezcla de la reacción empleada y en el cuadro 4 las condiciones de la PCR.

Marcador	DNA	Buffer 10x	dNTPs	Taq-pol	MgCl	H ₂ O	Volumen final
DXS	1.2 µl	0.75 µl	0.94 µl	0.06 µl	0.45 µl	3.6 µl	7 µl

Cuadro 3. Muestra la mezcla de reacción empleada.

VIII.- RESULTADOS.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La actividad enzimática de la SE (0.0 pmol/ mg proteína hr) fue nula en los 5 varones diagnosticados clínicamente como ILX, en las madres portadoras de 1.05-1.10 pmol/ mg proteína/ hr por debajo de los controles sanos que reportaron de 1.73-1.90 pmol/mg de proteína hr (cuadro 5).

ANÁLISIS MOLECULAR.

Ninguno de los pacientes amplificó mediante PCR los extremos 5' y 3' del gen STS (Figura 3), la deleción abarca las regiones DXS1139 a DXSF22S1, (Figuras 4 y 5) y en el cuadro 6 se muestra el resumen de los resultados de la amplificación por PCR para determinar la deleción del gen y regiones adyacentes al gen STS en los pacientes y control sano.

ANÁLISIS POR FISH.

Todas las madres portadoras mostraron una sola copia del gen STS y dos copias de la región centromérica del cromosoma X en 100 metafases analizadas de células de mucosa bucal (Figura 6).

ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATELITES

El análisis de segregación para detectar el origen parental se llevó a cabo en los pacientes, madres portadoras y abuelas maternas de los pacientes, el análisis mostró alelos informativos para la:

Familia 1: Paciente: **DXS987** (218.21 pb), **DXS993** (272.02 pb), **DXS1226** (288.98 pb).

Mamá: **DXS987** (218.24 pb / 214.47 pb), **DXS993** (270.22/ 272.17 pb), **DXS1226** (291.02 pb/289.10 pb). Abuela: **DXS987** (214.40 pb / 208.44 pb), **DXS 993** (270.21 pb /272.17 pb) y **DXS1226** (292.90 pb/291.02 pb) (Figura 7) (cuadro 7)

En la familia 2. Paciente: **DXS991** (331.53. pb), **DXS990** (127 pb).Mamá: **DXS991** (329.58/331.53 pb), **DXS990** (127.01 pb/ 128.94 pb). Abuela: **DXS 991** (329 pb), **DXS990** (125.19/128.98 pb) (Figura 8) (cuadro 7) .

En la familia 3. Paciente: **DXS1214** (290.28.pb), **DXS993** (277.57pb). Mamá: **DXS1214** (284.71pb / 290.55pb), **DXS993** (271.76pb/277.56pb). Abuela: **DXS1214** (284.72p / 286.53pb), **DXS993** (270.03pb/271.89pb) (Figura 9)(cuadro 7).

En la familia 4: Paciente: **DXS1226** (302.29 pb), **DXS993** (269.96pb); Mamá: **DXS1226** (290.83pb/302.29), **DXS993** (269.89pb); Abuela: **DXS1226** (290.84pb/302.24), **DXS993** (269.89/277.60) (Figura 10) (cuadro 7).

En la familia 5: Paciente: **DXS1060** (253.24pb), **DXS987** (208.05pb). Mamá: **DXS1060** (245.39pb/253.24pb), **DXS987** (208.05pb/213.88pb). Abuela: **DXS1060** (245.29), **DXS987** (213.89pb /215.29pb) (Figura 11) (cuadro 7).

	ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE LA SE		
	PACIENTE	MAMÁ PORTADORA	CONTROL SANO
FAMILIA 1	0.00	1.05	1.75
FAMILIA2	0.00	1.20	1.90
FAMILIA3	0.00	1.20	1.75
FAMILIA 4	0.00	1.20	1.75
FAMILIA 5	0.00	1.10	1.73

Cuadro 5. Actividad de la sulfatasa de esteroides (SE) de los pacientes con diagnóstico clínico de ILX, La actividad de la enzima se expresa en pmol / mg / proteína / h.

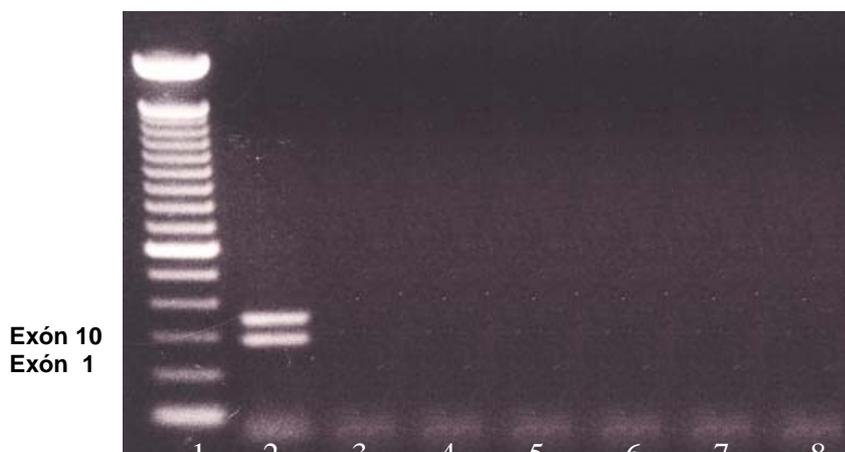


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa, que muestra la ausencia de los extremos 5` y 3` del gen STS, (exón 1-282 pb y exón 10-363pb) del carril 3 al 6 en los pacientes, comparados con un control sano (control positivo) en el carril 2. En el carril 1 se muestra marcador de peso molecular de 100pb. En carril 8 control negativo (blanco).

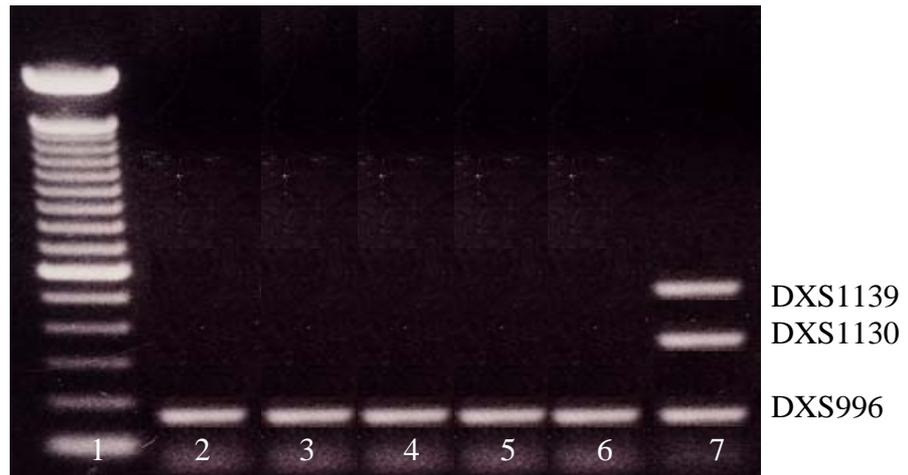


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa, muestra la ausencia de las regiones adyacentes (DXS1130-367pb y DXS1139- 500pb) en el extremo 5` del gen STS, los carriles 2-6 (pacientes) amplifican solo la región DXS996-153 pb, carril 7 (control sano) amplifican DXS1130, DXS1139 y DXS996. Carril 1 marcador de peso molecular.

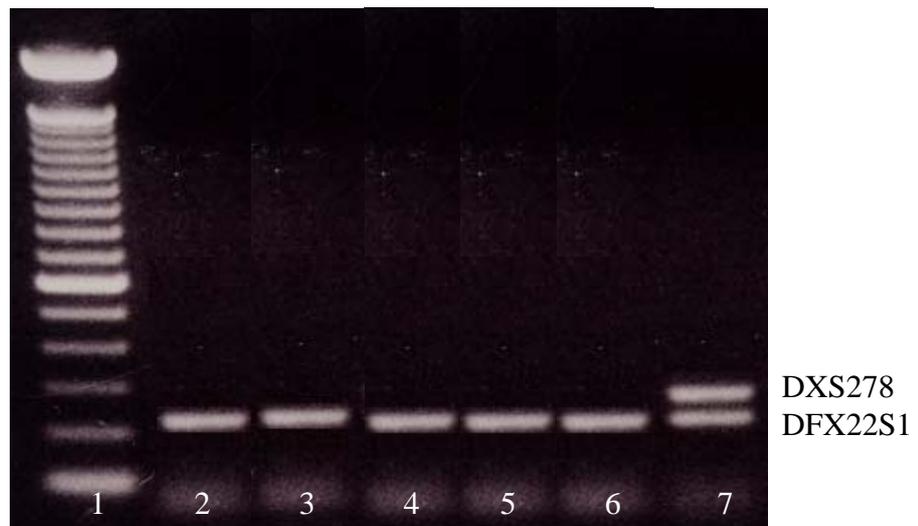


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa, muestra la ausencia de las regiones adyacentes DXSF22S1 (262 pb) en el extremo 3' del gen STS en los carriles 2-6 (pacientes) ,carril 7 muestra amplificación de DXSF22S1 y DXS278 (210pb9) en el control sano. Carril 1 muestra marcador de peso molecular.

PACIENTE	DXS 996	DXS 1139	DXS 1130	GEN STS 5'-----3'	DXS 1131	DXS 1133	DXS 237	DXS 1132	DXF 22S1	DXS 278
PX 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PX 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PX 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PX 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PX 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Control sano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 6. Resultados de la ausencia de amplificación por PCR de las regiones adyacentes al gen STS en cada uno de los pacientes. Control sano amplifica todas.

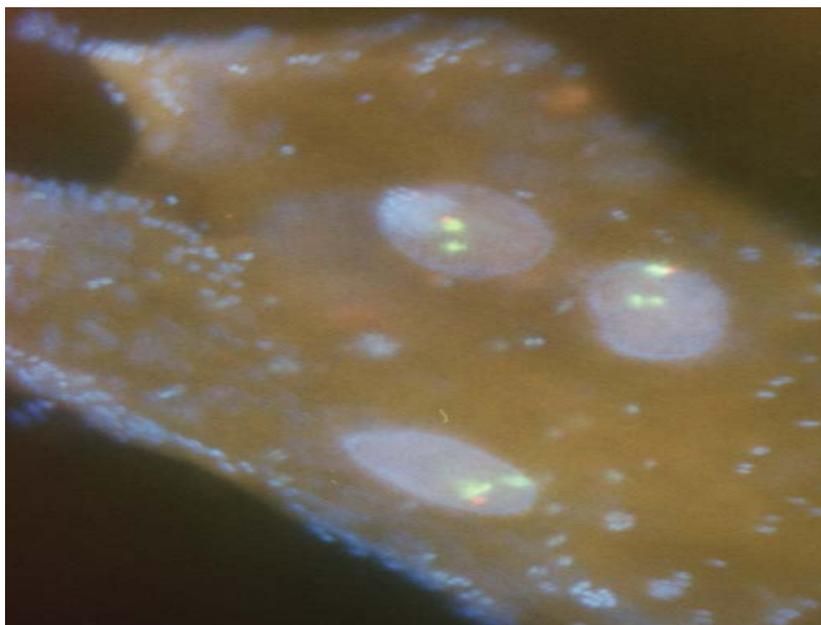


Figura 6. Señal para la sonda STS (fluorescencia naranja) y 2 señales (fluorescencia verde) que corresponde a región centromérica del X en FISH de raspado de mucosa bucal en 100 células analizadas.

RESULTADOS

	PAREN TESCO	DXS987 (206- 224pb) Xp22.2	DXS993 (265-289pb) Xp11.3-11.4	DXS990 (122-138pb) Xq	DXS1060 (243-263pb) Xp22.3	DXS991 (316-344pb) Xp11.1	DXS1226 (284- 306pb) Xp21	DXS1214 (279-293pb) Xp21
Familia 1	Abuela	208/214	270	135	245/249	324/334	291/293	291/291
	Abuelo	<u>218</u>	<u>272</u>	<u>134</u>	245	<u>330</u>	<u>289</u>	291
	Mamá	214/ <u>218</u>	270/ <u>272</u>	<u>134</u> /135	245/249	324/ <u>330</u>	291/ <u>289</u>	291/291
	Paciente	<u>218</u>	<u>272</u>	<u>134</u>	245	<u>330</u>	<u>289</u>	291
Familia 2	Abuela	218	270/278	125/129	245/247	329	291/298	289/ <u>291</u>
	Abuelo finado			<u>127*</u>		<u>331*</u>	<u>292*</u>	287*
	Mamá	218	270	<u>127/129</u>	245	<u>330/331</u>	291/ <u>292</u>	287/ <u>291</u>
	Paciente	218	270	<u>127</u>	245	<u>331</u>	<u>292</u>	<u>291</u>
Familia 3	Abuela	208	270/272	129/125	<u>245/253</u>	327/329	294/291	285/286
	Abuelo	208	<u>278</u>	129	251	327	294	<u>290</u>
	Mamá	208	272/ <u>278</u>	129	<u>245/251</u>	327	294	285/ <u>290</u>
	Paciente	208	<u>278</u>	129	<u>245</u>	327	294	<u>290</u>
Familia 4	Abuela	<u>208/219</u>	270/278	<u>127</u>	245/255	329	291/302	<u>292/296</u>
	Abuelo Finado	214*		125*	<u>243*</u>	<u>331*</u>		291*
	Mamá	<u>208/214</u>	270	<u>127/125</u>	<u>243/255</u>	<u>329/331</u>	291/302	291/ <u>292</u>
	Paciente	<u>208</u>	270	<u>127</u>	<u>243</u>	<u>331</u>	302	<u>292</u>
Familia 5	Abuela	214/216	272/285	<u>127/129</u>	245	<u>325</u>	290/299	288/290
	Abuelo finado	<u>208*</u>		135*	<u>253*</u>	327*		
	Mamá	<u>208/214</u>	272/285	<u>127/135</u>	245/ <u>253</u>	<u>325/327</u>	290/299	288/290
	Paciente	<u>208</u>	285	<u>127</u>	<u>253</u>	<u>325</u>	299	288

Cuadro 7. Muestra el tamaño de los 7 marcadores microsatélites que fueron no informativos, así como informativos para origen paterno como para materno utilizados en la familia 1, 2, 3, 4 y 5. El marcador informativo está subrayado. (*) Se dedujo alelo paterno.

Familia	Marcadores		
	Informativos		No informativos
	Paterno	Materno	
1	5	0	2
2	3	1	2
3	1	2	4
4	2	3	2
5	2	2	3

Cuadro 8. Muestra un resumen de los marcadores informativos (materno o paterno) y no informativos en las 5 familias estudiadas.

RESULTADO DEL GENE-SCAN PARA CADA FAMILIA

FAMILIA 1

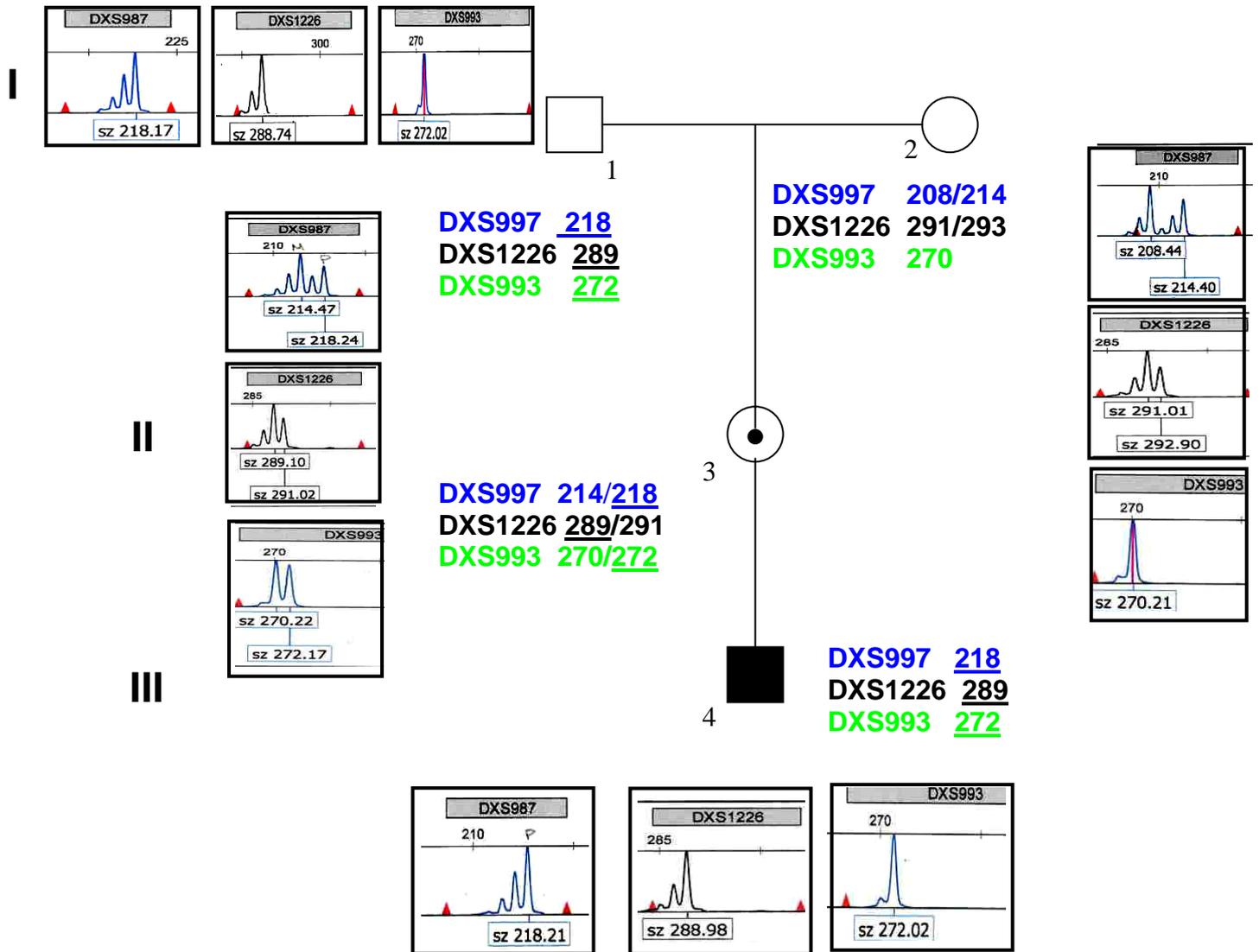


Figura 7. Ejemplifica a 3 (DXS987, DXS1226, DXS993) de los 5 marcadores informativos en el paciente, la madre, la abuela y el abuelo en la familia 1.

FAMILIA 2

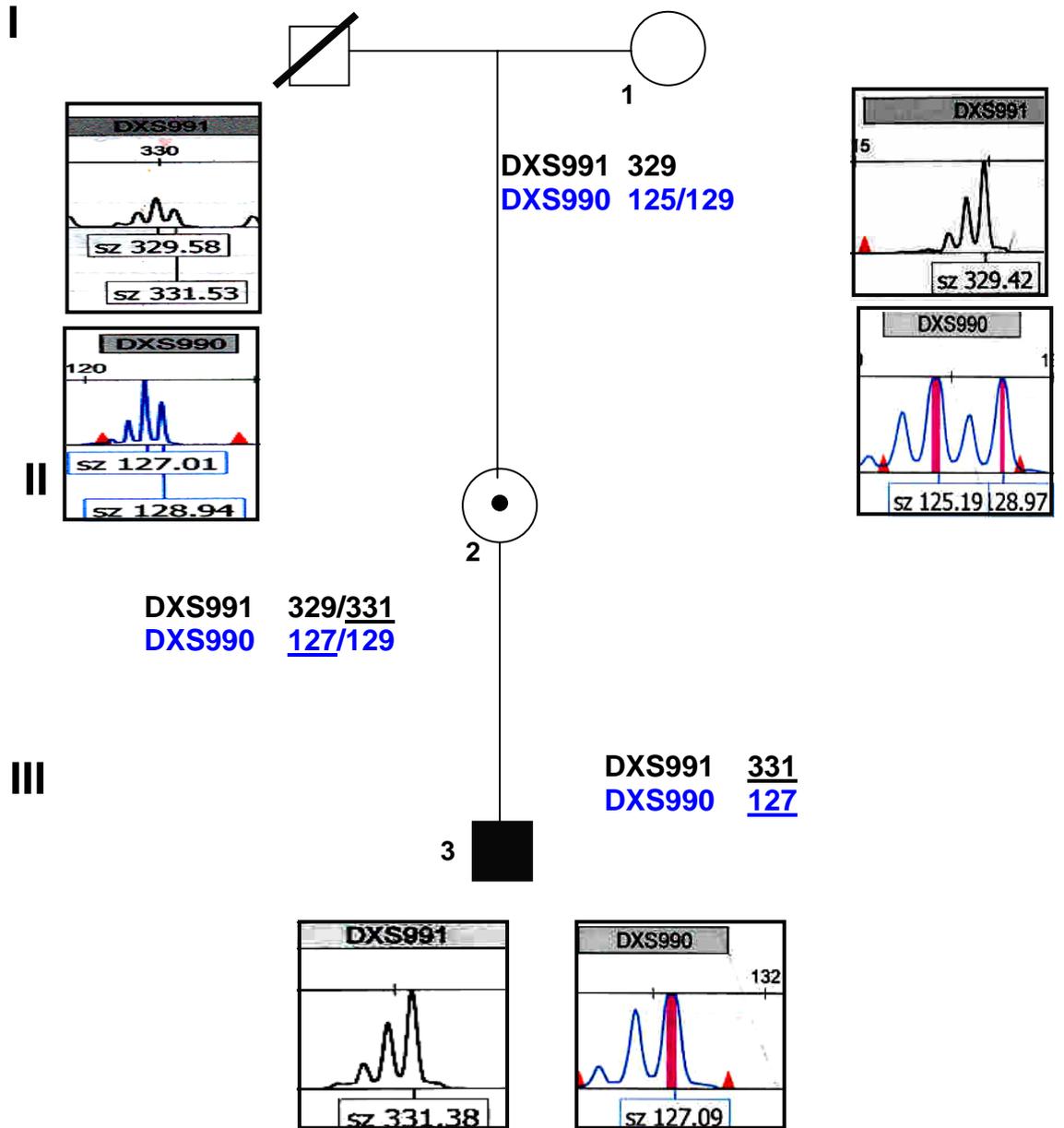


Figura 8. Ejemplifica a 2(DXS991 y DXS990) de 3 de los marcadores informativos en el paciente, madre y abuela en la familia 2.

FAMILIA 3

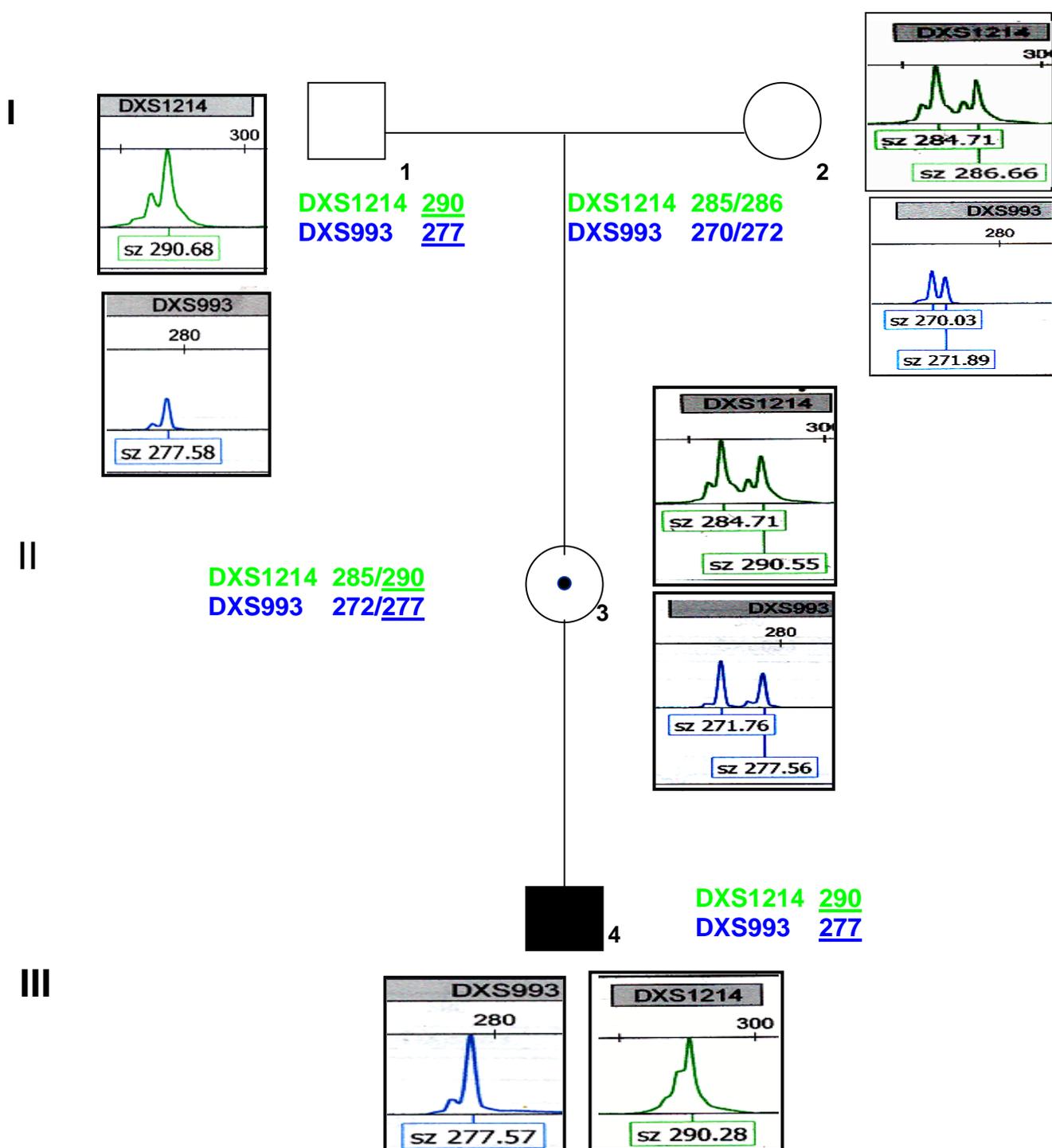


Figura 9. Ejemplifica a 2 marcadores informativos (DXS1214 y DXS993) en el paciente, madre, abuela y abuelo de la familia 3.

FAMILIA 4

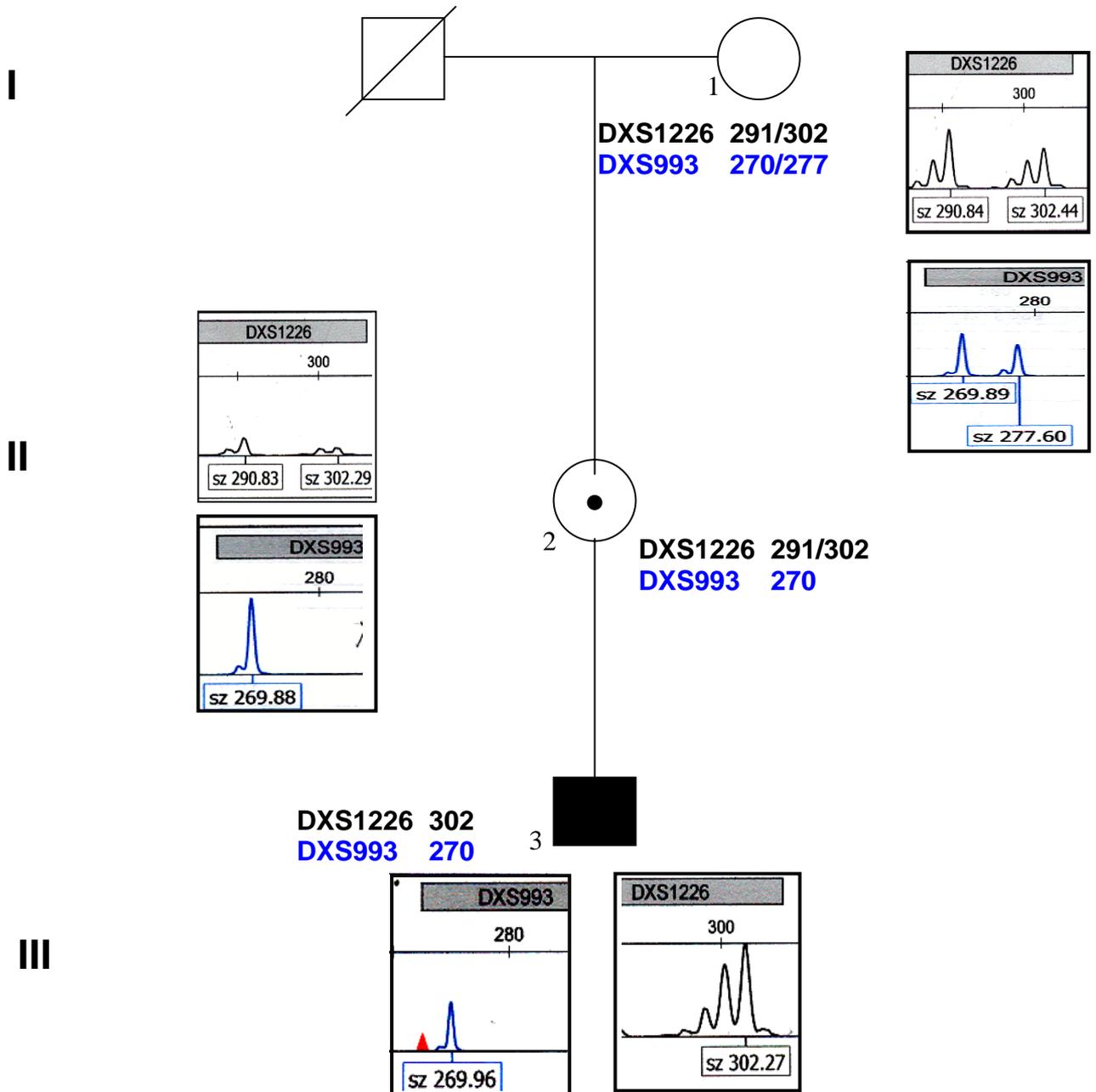


Figura 10. Ejemplifica a 2 marcadores no informativos (DXS1226 y DXS993) en el paciente, madre y abuela de la familia 4

FAMILIA 5

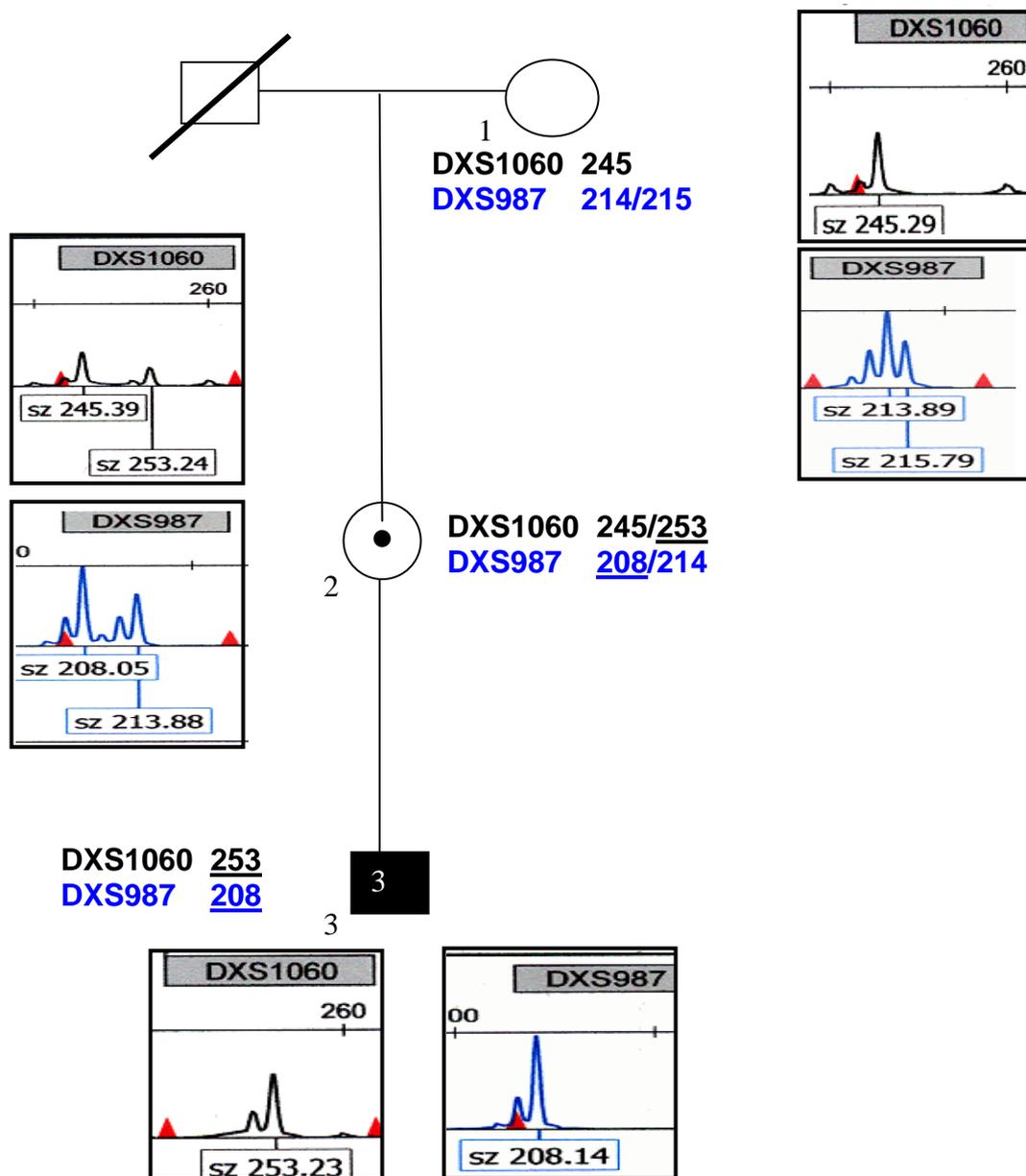


Figura 11. Ejemplifica a 2 marcadores (DXS1060 y DXS987) informativos en el paciente , la madre y la abuela de la familia 5.

IX. DISCUSION

La mayoría de los pacientes con ILX (90%) presentan pérdida total del gen *STS* y secuencias flanqueadoras. Se ha propuesto que el mecanismo que genera estas deleciones es la recombinación homóloga desigual entre secuencias repetidas ubicadas en el brazo corto del cromosoma X (40-46, 50-51). Las secuencias G1.3 y CRI-S232 están distribuidas sobre el brazo corto del cromosoma X flanqueando genes como *MIC2* (antígeno de superficie reconocido por anticuerpo monoclonal), *Xg* (gen del grupo sanguíneo *Xg*), *CDPX* (condrodisplasia punctata), *KAL* (síndrome de Kallmann), *MRX* (retardo mental ligado al X) y *STS* (sulfatasa de esteroides) (37). La presencia de estos repetidos de bajo número de copias a los lados del *locus STS* parece tener un papel en la alta frecuencia de deleciones intersticiales y secuencias flanqueadoras del gen promoviendo la recombinación desigual. CRI-S232 está presente en el cromosoma X con un alto grado de polimorfismo, siendo monomórfico en el cromosoma Y (40-43). CRI-S232 se divide en 4 regiones (a-d) mediante el uso de varias enzimas de restricción. Las secuencias b+c contienen secuencias repetidas en tándem llamadas RU1 y RU2. La secuencia RU1 está compuesta de unidades repetidas heterogéneas de 30pb de largo mientras RU2 contiene unidades repetidas de 4pb de longitud (42). Estudios previos sugieren que la deleción total del gen *STS* es causada por la recombinación homóloga desigual entre el *locus* DXS1139 y los *loci* DXSF22S1 o DXS278. Estos *loci* contienen secuencias homólogas y se piensa que su recombinación se lleva a cabo por su contenido de secuencias VNTR del RU2 (44-45). Estudios en nuestro laboratorio reportan en la ILX, una frecuencia de rupturas del gen *STS* y secuencias flanqueadoras homólogas similar a lo observado en otras poblaciones, sin embargo también reportan rupturas heterogéneas en sitios que no corresponden a secuencias homólogas (46).

Con estos antecedentes nos propusimos investigar si el evento de recombinación homóloga desigual era frecuente en la génesis de la pérdida del gen *STS* en la ILX. Para esto, estudiamos inicialmente el origen parental del cromosoma X afectado. Se analizaron 5 familias diagnosticadas clínicamente como ILX. El estudio molecular mediante FISH y PCR amplificando los exones 1 y 10 de gen *STS* demostró en todos los casos la pérdida completa del gen. Se realizó también mediante PCR el análisis de las secuencias flanqueadoras. Esto permitió delimitar el patrón de deleción que abarcaba las regiones adyacentes 5' DXS1139 hasta DXF22S1 3', resultados que concuerdan con lo reportado previamente (44-46), cabe mencionar que estas secuencias involucran regiones homólogas. El análisis de segregación de las 5 familias para

identificar el origen paterno o materno del X afectado mediante Gene-Scan, mostró en la familia 1 que la segregación del X afectado era de origen paterno, siendo los marcadores informativos DXS987, DXS993, DXS991, DXS1226, DXS1214; en la familia 2 los resultados sugieren fuertemente que el origen del cromosoma afectado es paterno, siendo los marcadores informativos DXS990, DXS991 y DXS1226; en el resto de las familias los marcadores fueron no informativos e insuficientes para poder inclinarnos hacia el origen del cromosoma X afectado. Los marcadores informativos para la familia 3 fueron: DXS993 y DXS1214, en la familia 4: DXS1060 y DXS991 y para la familia 5: DXS987 y DXS1060. El hecho de que los resultados descarten el origen materno del cromosoma X en la primera familia sugiere que el mecanismo de pérdida de la región involucrando al gen *STS*, no es únicamente consecuencia de una recombinación homóloga desigual durante la meiosis femenina como se ha venido proponiendo. Esta teoría surgió cuando se descartó el mecanismo propuesto por Gillar que hace referencia a un intercambio X-Y anormal en la meiosis masculina, debido a un entrecruzamiento anómalo en regiones del cromosoma X-Y ubicadas cerca de la región pseudoautosómica⁽³⁹⁾. Sin embargo, la distancia a la que se encuentra esta región y la presencia del antígeno *Xg*, descartó esta propuesta inicial, surgiendo la teoría de la recombinación homóloga desigual entre ambos cromosomas X ⁽³⁹⁾.

Curiosamente, las regiones flanqueadoras al gen *STS* ausentes en nuestros pacientes correlacionan a lo reportado previamente en la cual se incluyen a las secuencias homólogas ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ Este hallazgo parecería reforzar el postulado de la recombinación homóloga desigual como la causa que genera la pérdida del gen *STS* en la ILX. Sin embargo, parecería ser que el mecanismo de pérdida del gen *STS* y secuencias flanqueadoras no depende totalmente del sitio de ruptura ⁽⁴⁶⁾ y muy seguramente está implicado otro tipo de mecanismo como podría ser el *apareamiento erróneo de bases por deslizamiento de las cadenas del DNA* ⁽⁵²⁾ como lo propusimos en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio ⁽⁴⁶⁾. Este proceso, que de igual forma involucra secuencias homólogas, ha sido postulado para explicar la causa de otros padecimientos como el que origina la mayoría de las pequeñas deleciones en la hemoglobina Gun Hill ⁽⁵²⁾. Brevemente, se produce cuando en la replicación una doble cadena de ADN contiene secuencias repetidas (R1 y R2); este DNA se separa en dos cadenas sencillas en la horquilla de replicación. La secuencia repetitiva R2 se aparea de manera errónea con la secuencia repetitiva complementaria R1', desplazando la secuencia R1 y su secuencia adyacente, formando de esta manera una especie de bucle con estas secuencias. El bucle es eliminado de la cadena sencilla, mientras que la cadena de ADN se repara, así en las cadenas dobles hijas, una de ellas tendrá una

ola secuencia repetida y le faltará la secuencia repetida R1 así como las secuencias

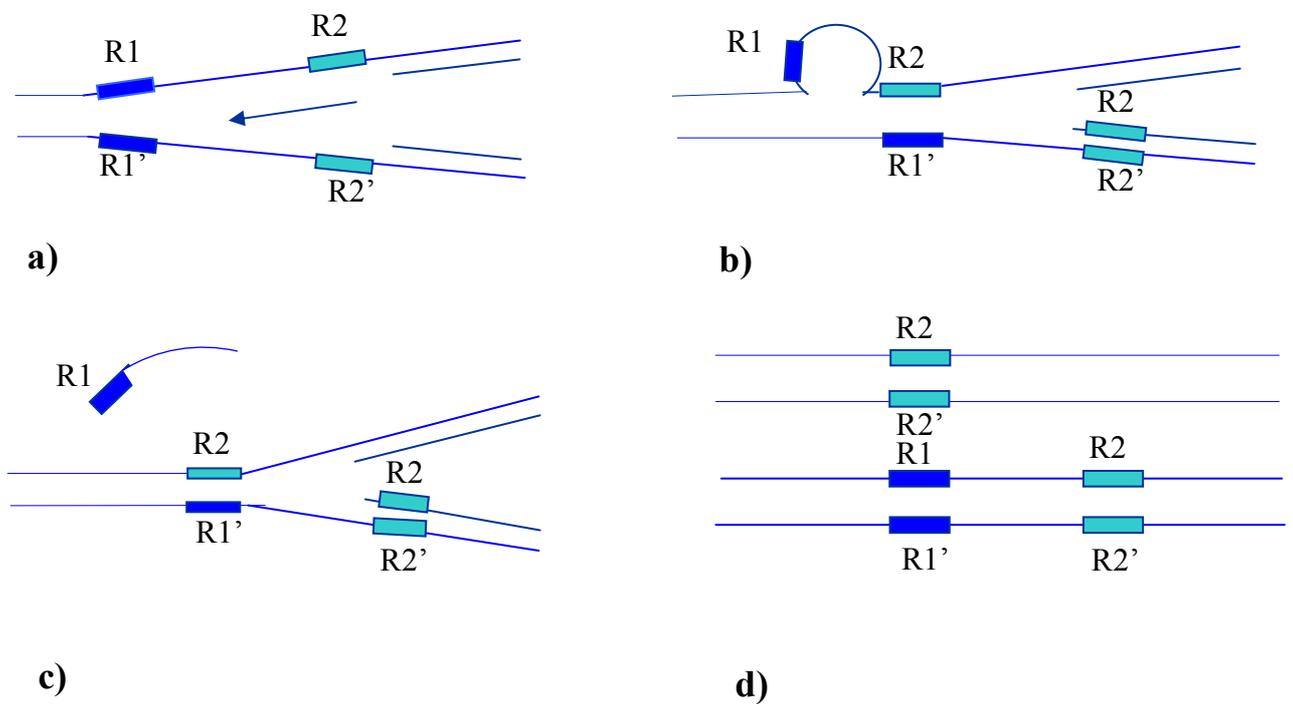


Figura 12. Mecanismo apareamiento erróneo de bases por deslizamiento en la cadena del DNA.

Creemos posible que este mecanismo de apareamiento erróneo de bases por deslizamiento en las cadenas del DNA es una causa plausible que está generando la pérdida del gen *STS* en la ILX y no únicamente la recombinación homóloga desigual como se había propuesto. El origen paterno del X afectado nos permite excluir a este último como único mecanismo en la génesis de la pérdida del gen *STS*.

En conclusión podemos señalar que de las 5 familias, en 1 se corrobora y en otra se sugiere fuertemente que el X afectado en la madre portadora viene de línea germinal paterna, seguramente por una mutación nueva generada en el padre durante la gametogénesis. Esto descarta la recombinación homóloga desigual durante la meiosis femenina como único mecanismo molecular que provoca la deleción total del gen *STS* y sus regiones flanqueadoras. Sin embargo es importante aumentar el número de marcadores microsatélites en las 3 familias que fueron poco informativos para confirmar el origen parental del cromosoma X afectado.

XI. - BIBLIOGRAFÍA.

- 1-Cockayne EA.Inherited Abnormalities of the Skin and Its Appendages.London:Oxford University Press,1933.
- 2- Wells RS,Kerr CB.Genetic Classification of ichtiosis.Arch Dermatol 1965;92: 1-6. X-linked ichth
- 3- Shwayder T, Ott F. All about ichthyosis. Pediatric Clin North Am 1991; 38:835
- 4- Wells RS,Kerr CB. The Histology of Ichthyosis.J.Invest Dermatol 1966;46: 530-5.
- 5- Scriver Ch, Beaudet A, Sly W. The metabolic and molecular bases of inherited disease, seventh edition. Mc Graw-Hill; 1995:2999-3017.
- 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- Alpher J.C. Genetic disorders of skin, 2th edition.Toronto. Mosby year book; 1991:173-75.
- 8- Sever R,Frost P, Weinstein GD, Eye changes in ichthyosis .J A Med Assoc 1968; 206: 2283-6
- 9- Lykkesfeldt G, Nielsen MD, Lykkesfeld AE. Placental steroid sulfatase deficiency: biochemical diagnosis and clinical review. Obstet Gynecol 1984;64:49-54.
- 10- Merret JD, Wells RS, Kerr C, Barr A. Discriminant function analysis of phenotype variantes in ichthyosis. Am J Hum Genet 1967; 19 (4): 575-85.
- 11- Shapiro LJ(1985) Adv.Human Genetic.14, 331381.
- 12- Shapiro LJ, Buxman MM, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. Lancet 1978;2:756.
- 13- French AP, Warren JC. Properties of steroid sulfatase and arylsulfatase activities of human placenta Biochem J,1969; 105:410

- 14- Vaccaro AM, Salviolo R, Renola I. Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme*. 1987; 7:115.
- 15- 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.
- 16- Baden HP, Hooker PA, Kubilus J. Sulfatase activity of keratinization tissues in x-linked ichthyosis. *Pediatr Res*. 1980;14:1487.
- 17- Bergner EA, Shapiro LJ. Metabolism of DHEA sulphate by subjects with steroid sulphatase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1988; 11:403.
- 18- Matsumoto T, Sakura N. Steroid sulfatase activity in nails screening for X-linked ichthyosis. *Pediatr Dermatol*. 1990; 4:266.
- 19- Hobkin R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63:1127.
- 20- Dibbelt L, Kuss E. Human placental sterolsulfatase interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition state analogues acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem*. 1991;372:173.
- 21- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SI. Structure of a human lysosomal sulfatase structure. 1997;5:277.
- 22- Yen PH, Marsh B, Allem E, Mohandas T, Shapiro LJ, Organization of the human steroid sulfatase gene. *Am J Hum Genet*. 1987;41:248.
- 23- 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.
- 24- Mueller C, Walhssstrom J, Rogers H. Further evidence for assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp. *Hum Genet*. 1981; 58:446.

- 25- Stein C, Hille A. Cloning and expression of human steroid sulfatase. *J Biol Chem* 264:13865, 1989.
- 26- Ballabio A, Parenti G, Carozzo 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.
- 27- Fraser N, Ballabio A, Zollo M, Persico MG, Identification of complete sequences steroid sulphatase on the human Y chromosome: evidence for ancestral pseudoautosomal gene. *Development* 1987;101:127
- 28- 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.
- 29- 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.
- 30- Thompson Mw, McInnes RR, Willard HF. *Genética en medicina*, 5a. Ed., Masson SA, Barcelona 2004.
- 31- Morita E, Katoh O, Shinoda S. A novel mutation in steroid sulfatase gene in X-linked ichthyosis. *The society for investigative Dermatology Inc* 1997. *J invest Dermatol* 1997;109: 244-245.
- 32- 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.
- 33- 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.
- 34- 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.

- 35- 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.
- 36- 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.
- 37- Ballabio A, Bardoni B, Carrozzo R, Andria G, Bick D, Campell, Hamel, Ferguson MA, Gimelli G, Fraccaro M, Maraschio P, Zuffardi O, Camerino G. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. Proc.Natl.Acad.Sci USA. 1989; 86:10001-5.
- 38- Gonzalez LM, Messina O, Toral J, Rivera MR, Kofman SH, Cuevas SA. Point Mutation in the Gene STS in Severely Affected Patient with X-linked Recessive Ichthyosis.
- 39- Gillar EF, Affara NA, Yates JR, Goudie DR, Lambert J, Aitken DA, Ferguson MA. Deletion of a DNA sequence in eight of nine families with X-linked ichthyosis. (steroid sulphatase deficiency). Nucleic Acids Research. 1987; 10(15):3977-3985.
- 40- Ballabio A, Bardoni B, Guiolli S, et al. Two families of low-copy-number repeats are interspersed on Xp22.3: implications for the high frequency of deletions in this region. Genomics. 1990;8:263-270.
- 41- Yen P, 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. 1990; 51: 603-610.
- 42- 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.
- 43- Yen PH, Li X -M, Tsai S-P, Johnson 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.

- 44- Saeki H, Kuwata S, Nakagawa H, et al. Deletion pattern of steroid sulphatase gene in Japanese patients with X-linked ichthyosis. *Br.J.Dermatol.*1998; 139: 96-99.
- 45- Aviram-Goldring A, Goldman B, Netanelov-Shapira I, 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. *In.J.Dermatol.* 2000;39:182-187.
- 46- Jiménez-Vaca AL, Valdes-Flores M, Rivera-Vega MR, González-Huerta LM, Kofman-Alfaro SH, Cuevas-Covarrubias SA. Deletion Pattern of the STS Gene in X-linked Ictiosis in a Mexican Population. *Molecular Medicine.* 2001;72(12):845-849.
- 47- Petronczki M, Siomos M, Nasmyth. Un Ménage á Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell.* 2003; 112: 423-440.
- 48- Kunz C and Schär. Meiotic Recombination: Sealing the Partnership at the Junction. *Current Biology.*2004;14: 962-964.
- 49- McDougall A, Elliot D, Hunter N. Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. *EMBO reports.* 2005;6:2: 120-125.
- 50- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics.* Review 2002;(2) 18:74-81.
- 51- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics,* Review 2004;13: 57-64.
- 52- Cooper DN, Krawcsak M. The slipped mispairing mechanism. *Human Gene Mutation,* BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- 53- GenScan Reference Guide. ABI PRISM 310 Genetic Analyzer V.2. Applied Biosystems 1997.
- 54- Luque J, Herraiz A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Tema 10; Organización del genoma eucariótico. 107-116. Harcourt S.A..Madrid ,España. 2001

55- Passarge E. Organization of Eukariotic Genomes. Color Atlas of Genetics. 2nd Edtion,244-5. Thieme.New York ,U.S.A. 2001.