

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *KRT9* EN UNA FAMILIA MEXICANA CON
QUERATODERMIA PALMOPLANTAR EPIDERMOLÍTICA**

TESIS DE POSGRADO

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

JAIME ASael LÓPEZ VALDEZ

JEFE DE SERVICIO: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

ASESOR DE TESIS: DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA

MÉXICO, D.F.

JULIO 2009.



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.

**“ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *KRT9* EN UNA FAMILIA MEXICANA CON
QUERATODERMIA PALMOPLANTAR EPIDERMOLÍTICA”**

ASESORES DE TESIS

**DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA
MÉDICO ADSCRITO
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

**DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
JEFE DE SERVICIO
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

**“ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *KRT9* EN UNA FAMILIA MEXICANA CON
QUERATODERMIA PALMOPLANTAR EPIDERMOLÍTICA”**

PRESENTA:

JAIME ASael LÓPEZ VALDEZ

ASESORES DE TESIS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

COLABORADORES:

M. EN C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

DR. JORGE CAZARÍN BARRIENTOS

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

México, D.F., julio 2009.

Cuando yo encuentre a mi médico ideal pondré en sus manos esta memoria. Yo no necesito que mi médico ideal sea infalible. Aparte de las condiciones de general aptitud y aún de simpatía –yo, sin esto, no ando– sólo pido de él dos cosas:

Primero, que sea además de un médico, un sabio. Es decir –limitemos la terrible palabra– que el médico pragmático, el que cura y prescribe tratamientos, se acompañe en él de un estudioso desinteresado, de un lector asiduo que no duerme si no ha despojado antes los catálogos de novedades, de un poeta del pensamiento capaz de pasarse un día entero de buen humor cuando ha encontrado la expresión feliz para bautizar un síntoma.

Y segundo, que se resigne a trabajar conmigo, a explicarme lo que se propone hacer conmigo y lo que piensa de mí, a asociarme a su investigación. Yo reclamo el privilegio de juez y parte, porque soy capaz de desdoblamiento y sé muy bien considerarme objetivamente y con frialdad. Además estoy seguro de que yo puedo ayudarle a mi médico, de que orientado por él, puedo proporcionarle datos preciosos. Finalmente, el médico que no cuente con mi inteligencia está vencido de antemano, el que quiera curarme sin contar con mi comprensión, que renuncie. Lo que no acepte mi mente, difícilmente entrará en mi biología. Tal es mi modo de ser, y seguramente hay muchos pacientes de mi género. Los médicos deberían pensarlo seriamente, y aceptar nuestra colaboración con humildad.

Alfonso Reyes

DEDICATORIA

Para todos los pacientes con una enfermedad incurable.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme cumplir otro paso en mi carrera.

A Adriana, por ser mi gran amor, “tu no”.

A mis padres y hermanos, por haberme dado los principios y todo para estar aquí.

A la familia de Adriana y a las niñas por todo su apoyo.

A mis maestros: Alicia Cervantes, Refugio Rivera, Carlos Venegas, Gloria Queipo, Juan Manuel Valdés, Carlos Cuevas y Susana Kofman por ser mis maestros y un ejemplo a seguir.

Al Dr. Jorge Cazarín por su revisión crítica y entusiasmo en este trabajo.

A Elvira Galvéz, Adriana del Castillo, Adrian Pérez, Rosy Arana, Karem Nieto, Verónica Madrid por sus enseñanzas en citogenética.

A Luz María González, Mariana Arellano, María Del Moral, Alicia Guerrero por su paciencia y entusiasmo, porque sino, no hubiera podido realizar este trabajo.

A mis compañeros residentes, por sus enseñanzas y amistad.

A todos los demás trabajadores del Servicio de Genética que me apoyaron para que cada día realizaré mi trabajo adecuadamente.

Y finalmente, a los pacientes que acuden al servicio de genética, son los mejores maestros.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	6
II.	ANTECEDENTES	
	a. Estructura y Función de las Queratinas	7
	b. Queratodermias Palmoplantares	15
	c. Queratodermia Palmoplantar Epidermolítica	
	• Definición e Incidencia	17
	• Etiología	17
	• Cuadro Clínico	20
	• Alteraciones Patológicas y Ultraestructurales	21
	• Diagnóstico	22
	• Diagnóstico Diferencial	23
	• Tratamiento	23
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	25
IV.	OBJETIVOS	26
V.	HIPÓTESIS	26
VI.	DISEÑO DEL ESTUDIO	27
VII.	MÉTODO	
	a. Pacientes	28
	b. Estudio Molecular del Gen <i>KRT9</i>	28
VIII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
IX.	ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	32
X.	RESULTADOS	33
XI.	DISCUSIÓN	39
XII.	CONCLUSIONES	43
XIII.	ANEXOS	
	1. ANEXO 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.	44
	2. ANEXO 2: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN <i>KRT9</i> .	45
XIV.	REFERENCIAS	47

I. RESUMEN

Las queratodermias palmoplantares son un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios y adquiridos en los cuales se observa hiperqueratosis. La queratodermia palmoplantar epidermolítica es la forma hereditaria más frecuente, con un patrón de herencia autonómico dominante, ocasionado principalmente por mutaciones en el gen *KRT9* que codifica para la queratina 9. Clínicamente se caracteriza por queratodermia difusa en palmas y plantas que inicia entre los 3-12 meses de edad, que se completa a los 3-4 años. En ocasiones se acompaña de almohadillas en la parte dorsal de las articulaciones interfalángicas en pies y manos. El diagnóstico es clínico, histopatológico y molecular con la detección de la mutación en el gen de la queratina 9.

En el presente trabajo se realiza el estudio genealógico, clínico, histológico y molecular de una familia con queratodermia palmoplantar epidermolítica, en los cuales se encontró mutación heterocigota cC487T que ocasiona un cambio en la traducción de una arginina por triptofano en el aminoácido 163 y funcionalmente evita que la queratina 9 pueda formar filamentos intermedios.

II. ANTECEDENTES

a. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS QUERATINAS

Las queratodermias palmoplantares (QPP) hereditarias son un grupo heterogéneo de genodermatosis caracterizadas por un marcado engrosamiento de la epidermis de las palmas y las plantas.^{1,2}

El citoesqueleto celular está compuesto de microtúbulos (25 nm de diámetro), microfilamentos (6 nm) y filamentos intermedios (FI) (10 nm). Los filamentos intermedios son esenciales para la estructura y función normal de la célula, son codificados por una familia de >70 genes y están divididos en 6 tipos. Las queratinas comprenden el tipo I; las cito (epitelial) y tricocito-queratinas (pelo/duro), el tipo II; vimentina, desmina, periferina y proteína ácida fibrilar glial, el tipo III; neurofilamentos (NF-L, NF-M, NF-H), nestina, sincolina, sinemina α y β y α internexina, el tipo IV; las láminas nucleares, el tipo V y los filamentos intermedios de los lentes del ojo (faquinina y filensina) el tipo VI.³⁻⁷

Las queratinas son miembros de la familia de los filamentos intermedios expresadas exclusivamente por las células epiteliales o queratinocitos, son el mayor componente estructural de la epidermis, uñas y pelo, ya que de todas las escamas superficiales diferenciadas comprende hasta 85% de las proteínas celulares totales. Las queratinas son las responsables de proteger a las células epiteliales contra el estrés mecánico, actúan como plataforma de señalización y mantienen la homeostasis del epitelio. Además, son un andamiaje altamente dinámico porque contribuyen a la determinación del tamaño celular, control de la traducción, proliferación, distribución de vesículas y organelos, pigmentación de la piel, migración celular, cierre de heridas, disminución de la transformación maligna, respuestas al estrés y apoptosis; dichas funciones son controladas por un patrón complejo de fosforilación y asociaciones moleculares.^{3,8-11}

En la epidermis basal, el citoesqueleto de queratinas protege al queratinocito del estrés mecánico a través de la formación de una red pancitoplásmica tridimensional que se extiende entre el núcleo y la membrana celular y se asocia con complejos de proteínas de adhesión, las cuales son parte de los desmosomas y hemidesmosomas. Los complejos de desmosomas se expanden por la membrana y funcionan como puntos de adhesión entre los queratinocitos por medio de la desmoplaquina I. Estas uniones intercelulares forman una red estructural que conecta las células entre sí y contribuyen a la estabilidad estructural y flexibilidad de los tejidos epiteliales.^{3,11-13}

Estructuralmente las queratinas son proteínas alfa-hélice compuestas de un dominio central en barra alfa hélice, un dominio de cabeza amino-terminal y una región de tallo carboxi-terminal. El dominio central en barra alfa hélice de aproximadamente 310 aminoácidos, encargado de la dimerización y la polimerización de orden superior está compuesto de 4 dominios (1A, 1B, 2A y 2B) separados por 3 dominios ligandos no helicoidales (L1, L12 y L2). Entre las queratinas su mayor homología es en la secuencia del dominio en barra alfa hélice y con mayor variación en el dominio cabeza-tallo. Las regiones amino y carboxi terminal del dominio en barra central, son altamente conservadas entre los filamentos intermedios, denominadas motivos de iniciación y terminación del hélix respectivamente, importantes para la formación y estabilidad de los filamentos.¹⁵ Hay una discontinuidad en el hélix o salto (S) que puede localmente alterar el carácter del hélix. Las regiones de la cabeza E1, V1 de 153 residuos y el tallo E2, V2 de 163 residuos consisten de dos regiones variables y dominios terminales. Los subdominios V contienen un número variable de residuos que contienen péptidos repetidos y los E contienen residuos altamente cargados. Los subdominios H son extensiones hipervariables que contienen sitios blanco para fosforilación (*figura 1*).^{4,7,8,12,14,16}

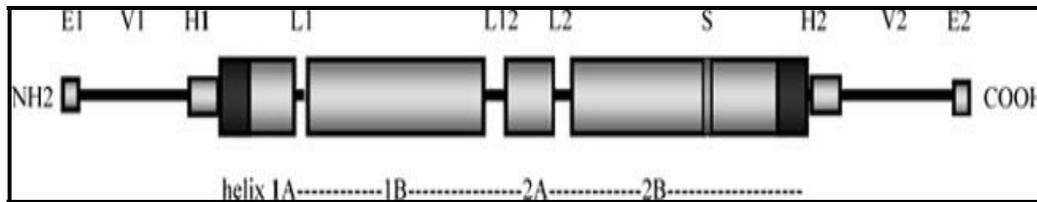


Figura 1. Esquema que representa la estructura de la proteína queratina. El dominio en barra alfa-hélice está compuesto de 4 dominios (1A, 1B, 2A y 2B), separados por 4 dominios ligandos no helicoidales (L1, L12 y L2) y la región S (salto). La cabeza y regiones del tallo están subdivididas en 2 dominios, el dominio variable (V1 y V2) y el dominio terminal (E1 y E2) y las regiones homólogas (H).^{7,17}

El dominio alfa-hélice central está compuesto de repetidos tipo héptada (*abcdefg*), con residuos hidrofóbicos en la posición *a* y *d*, y residuos polares en las otras posiciones. Los residuos en las posiciones *a* y *d* estabilizan la formación del dímero a través de efectos hidrofóbicos. Los residuos en las posiciones *e* y *g* lo estabilizan a través de iones y puentes de hidrógeno. Los residuos *a*, *d*, *e* y *g* están situados en la cara interna del hélix para interactuar con los residuos del hélix vecino de las dos cadenas y son considerados los más sensibles por presentar mutación. Cuando dos moléculas antiparalelas son alineadas, los primeros 10-11 residuos del dominio 1A y los últimos 10-11 residuos del dominio 2B juegan un papel muy importante en estabilizar el alineamiento. Los residuos en las posiciones 7-16 del segmento 1A son críticos para la estabilidad del filamento intermedio. Los dominios ligandos contienen prolina o múltiples residuos de glicina que rompen la barra alfa hélice para permitir la flexibilidad para el ensamble de los filamentos. Las terminales no helicoidales modulan las propiedades físico-químicas de los filamentos e imparten las propiedades tejido específico requeridas y facilitan la asociación lateral de las subunidades en la construcción de un filamento.^{3,7,18,19}

Se han descrito 54 genes funcionales de queratinas humanas (28 tipo I y 26 tipo II), de las cuales 34 son citoqueratinas y 25 son queratinas del pelo (4,7,9,10). Las 54 diferentes queratinas se dividen en dos tipos según su homología en la secuencia, tamaño y carga. Las tipo I son generalmente más pequeñas y ácidas, mientras las tipo II son más grandes y de carga básica (*figura 2*). Las tipo I incluyen a las queratinas K9-K28 y a las 10 queratinas del pelo K31-K40, codificadas por genes localizados en

17q12-q21. Las tipo II incluyen a las queratinas K1-K8 y a las 6 del pelo K81-K86, codificadas por genes localizados en 12q11-q13. Los filamentos de queratina son heterodímeros obligados compuestos de una queratina ácida y una básica, que se pueden ensamblar en un índice 1:1 en la ausencia de proteínas accesorias y cada heterodímero es regulado durante la diferenciación y proliferación de una manera tejido específico (*tabla 1*).^{3,5,7,10,13,14,20}

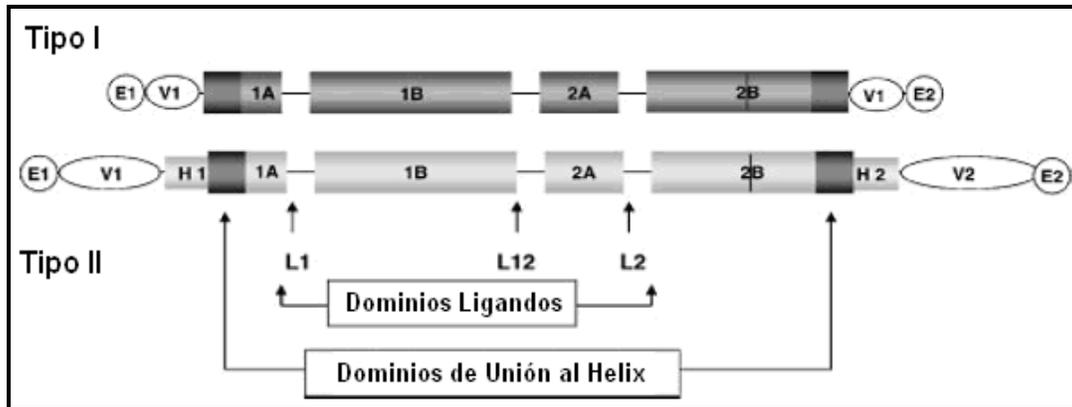


Figura 2. Esquema en el que se representa la estructura de las queratinas tipo I y II, nótese que las tipo II tienen dos dominios de homología H1 y H2 y sus dominios de cabeza y tallo son más grandes.

Los dímeros que se expresan tempranamente durante la vida embrionaria son el par K8 y K18 y el par K7 y K19.⁹ En el adulto, las células epidérmicas basales se diferencian totalmente y al cesar de dividirse inician su camino hacia la superficie de la piel, pasando por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos culminando en la producción de células enucleadas y planas, las cuales son descamadas de la superficie para ser reemplazadas continuamente por las células internas. Dicho ciclo dura de 3-4 semanas, a través de toda la vida de un individuo.⁸ En la epidermis, las células basales mitóticamente activas expresan principalmente las queratinas K5 y K14. Cuando los queratinocitos basales cesan de dividirse y pasan a la diferenciación terminal, se expresan las queratinas K1 y K10 y a partir de la capa granular también se expresa la queratina K2e. En la región palmoplantar se expresan la K1 y la K9. Las queratinas K6a y K16 son expresadas en la piel palmoplantar, células epiteliales, vaina de la raíz externa de los folículos pilosos, lecho ungueal, papilas filiformes de la lengua, epitelio de la mucosa oral, en respuesta a traumatismos o a hiperproliferación. Las tipo K6b y

K17 se expresan en los anexos y en la parte inferior de las crestas epidérmicas primarias profundas de las palmas y plantas. La tipo K4 y K13 son expresadas en la capa suprabasal del esófago y en córnea las tipo K3 y K12 (*figura 3*).^{3,5,10,12,13,14,21-23}

Tabla 1. Se muestran los dímeros de queratinas y el sitio en el que se expresan.¹⁰

TIPO II	TIPO I	PATRÓN DE EXPRESIÓN NORMAL
K1	K10	Células suprabasales del epitelio escamoso estratificado y cornificado.
¿K1?	K9	Células suprabasales de la epidermis palmoplantar.
K2	K10	Capa espinosa superior y granular.
K3	K12	Epitelio corneal.
K4	K13	Células suprabasales del epitelio escamoso estratificado no cornificado (mucosa urogenital).
K5	K14	Células basales del epitelio estratificado.
K6a	K16	Mucosa suprabasal urogenital, epidermis palmoplantar; anexos epidérmicos; trauma en epidermis folicular induce su expresión.
K6b	K17	Mucosa urogenital, epidermis palmoplantar; anexos epidérmicos; trauma en epidermis folicular induce su expresión.
K8	K18	Epitelio Simple.
K7	¿?	Epitelio simple, mioepitelio.
¿?	K15	Queratinocitos basales, folículo del pelo.
¿?	K19	Epitelio simple, folículo del pelo.
¿?	K20	Epitelio gastrointestinal.
K76	¿?	Capa de células superiores del paladar duro.
K77-K80	K6c, K15, K23, K24	Queratinas Epiteliales
K71	K25	Vaina de la raíz interna del folículo del pelo.
K72	K26	Vaina de la raíz interna del folículo del pelo
K73	K27	Vaina de la raíz interna del folículo del pelo
K74	K28	Vaina de la raíz interna del folículo del pelo
K75	¿?	Vaina de la raíz interna del folículo del pelo
K81	K31	Vaina del pelo (matriz, corteza, cutícula).
K82	K32	Queratinas del pelo.
K83	K33a	Queratinas del pelo.
K84	K33b	Queratinas del pelo.
K85	K34	Queratinas del pelo.
K86	K35	Queratinas del pelo.
	K36 a K40	Queratinas del pelo.

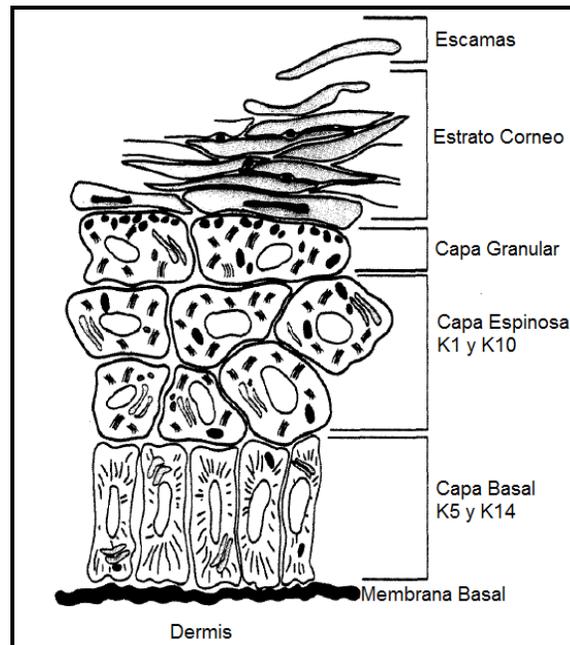


Figura 3. Se observa la diferenciación terminal de la epidermis, así como las queratinas que se expresan en cada capa de la epidermis.²⁰

Para la formación del filamento, los dominios en barra de las queratinas tipo I y II se alinean en paralelo con su dominio homólogo y se enrollan en forma cola-coleada, en la misma dirección, para formar un dímero de 48 nm de largo. Posteriormente, dos dímeros se unen lado a lado en una orientación antiparalela, escalonada para formar un tetrámero bidireccional. Los tetrámeros son los bloques de construcción de los filamentos de queratina, y son asociados lateral y longitudinalmente para formar filamentos de 10 nm, los cuales son importantes para la integridad estructural (*figura 4*).

Aproximadamente 20,000 heterodímeros de queratinas tipo I y II se ensamblan en un filamento intermedio. El ensamble y desensamble es regulado por ciclos de fosforilación y desfosforilación. La polimerización de los filamentos intermedios ocurre rápidamente y no requiere cofactores o proteínas asociadas.^{3,4,7,8,12,17,21}

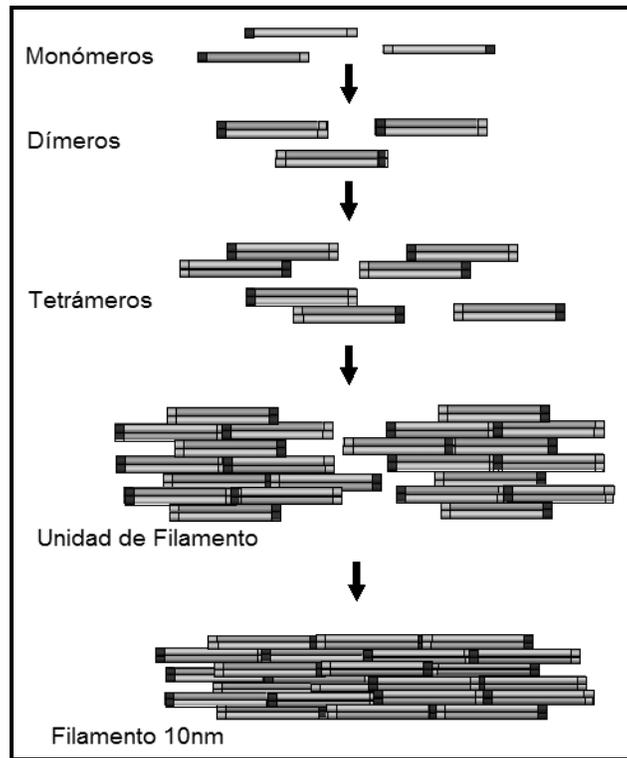


Figura 4. Modelo en el que se resume el ensamblaje de los filamentos intermedios. Se muestran sólo los dominios en barra.⁷

Las mutaciones en los genes de las queratinas pueden ser recesivas o dominantes. Las mutaciones recesivas que introducen un codón de paro prematuro o afectan el splicing del ARNm ocasionan la síntesis de un polipéptido truncado, el cual es degradado, y resulta en la ausencia de la proteína, lo que conduce a falta de formación de heterodímeros y filamentos intermedios.

La mayoría de las mutaciones dominantes causan reemplazo de aminoácidos no conservados en sitios altamente conservados, por lo que estos polipéptidos de queratina interfieren en un modo dominante negativo con las interacciones cabeza-tallo y el adecuado alineamiento de los heterodímeros, ocasionando un fenotipo severo.^{12,14,15}

La mayoría de las mutaciones de las queratinas son dominantes, causadas por mutaciones de sentido equivocado que alteran los aminoácidos en los motivos de iniciación (54%) o terminación del hélix (30%) (figura 5). El aminoácido más comúnmente alterado es un residuo de arginina cerca del inicio del hélix 1A que está conservado en todas las queratinas de tipo I, lo que causa un ensamblaje anormal de filamentos y colapso de la red filamentosa. Mutaciones fuera del hélix están frecuentemente asociadas con fenotipos leves, así como las que ocurren en los dominios de la cabeza o tallo resultan en condiciones distintas a las causadas por mutaciones en el dominio central.⁴

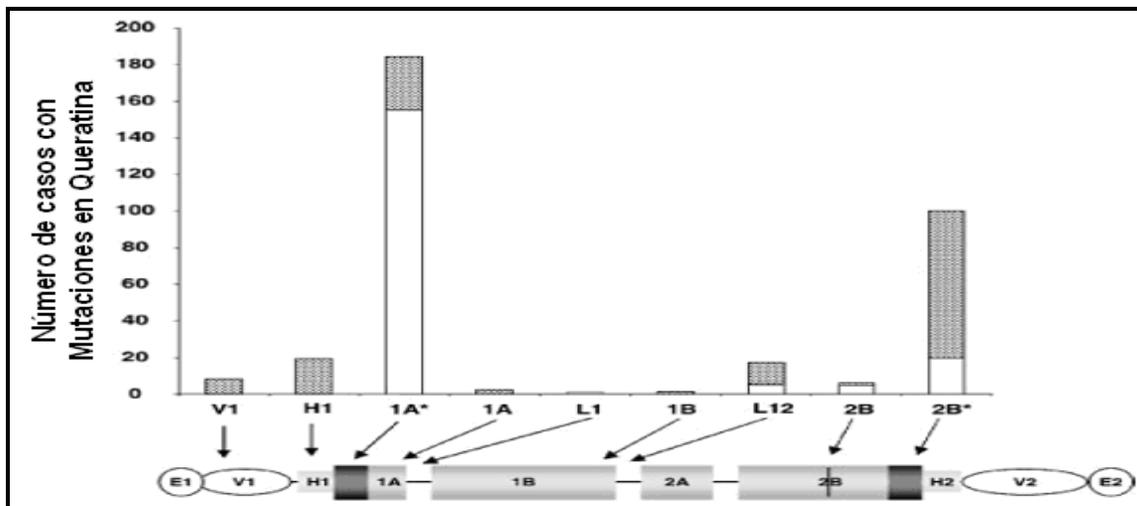


Figura 5. Gráfica en la que se muestran la distribución de las mutaciones de sentido equivocado a lo largo de la molécula de queratina. Las cajas claras son mutaciones en las queratinas tipo I y las sombreadas en la tipo II. 1A* y 1B* son regiones conservadas del hélix.⁴

Desde 1991 se han descrito mutaciones en 19 genes de las queratinas causantes de varias trastornos epiteliales con un amplio rango de manifestaciones clínicas con fragilidad epitelial que afectan la piel, mucosas, pelo, uñas y glándulas sebáceas, con un fenotipo diferente, que refleja el patrón de expresión de las queratinas mutadas. En general, una mutación en uno u otro miembro del par de queratinas lleva a la misma enfermedad, entre las que se encuentran la epidermólisis bulosa simple, QPP, ictiosis bulosa de Siemens, queratodermia estriada, eritrodermia ictiosiforme congénita bulosa y paquioniquia congénita, entre otras.^{4,12,14}

b. QUERATODERMIAS PALMOPLANTARES

Las **Queratodermias Palmoplantares** (QPP) representan un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios y adquiridos en los cuales se presenta hiperqueratosis de las palmas y plantas.^{21,24} Las QPP heredadas se deben a mutaciones en genes que codifican para proteínas involucradas en las estructuras celulares internas (queratinas), producción de membranas cornificadas (loricrina, transglutaminasa), moléculas de cohesión (desmosomas), de comunicación intercelular (conexinas), para traducción de señales transmembrana (catepsina C) y en función enzimática y mitocondrial.

Muchos de estos genes están involucrados en la formación de la membrana celular cornificada y en la diferenciación de los queratinocitos palmoplantares (*tabla 2*).^{2,14,22,23}

La incidencia de queratodermias palmoplantares no epidermolíticas en el Norte de Irlanda es de 1:23,000 y en el Sur de India de 5.2:10,000. La queratodermia palmoplantar epidermolítica presenta una incidencia de 4.4:100,000 en el Norte de Irlanda^{2,5} y entre niños escolares en Suiza tiene una frecuencia de 0.55%.²⁵

Las clasificaciones de las QPP están basadas en descripciones clínicas y morfología de las lesiones, severidad, modo de herencia, edad de inicio, presencia de lesiones en otras áreas, enfermedades o malformaciones asociadas y hallazgos histológicos. El diagnóstico es clínico, y en ocasiones es necesaria la confirmación por medio del examen anatomopatológico, bioquímico o detección de la mutación génica. Hay tres patrones clínicos: difusa, focal con hiperqueratosis en los puntos de fricción y punctata. La mayoría de las QPP se heredan con un patrón autosómico dominante, mientras otras con un patrón autosómico recesivo y esporádicas. Se ha observado una frecuencia de mutación en un gameto por generación de 9.6×10^{-5} .^{1,2,25-28}

Tabla 2. Se presentan los genes asociados con las QPP de acuerdo a su función.¹⁴

Genes Asociados con las Queratodermias Palmoplantares						
FUNCIÓN	GEN	LOCUS	PROTEÍNA	HERENCIA	ENFERMEDAD	OMIM
Estructural Intracelular	LOR	1q21	Loricrina	Autosómica Dominante (AD)	Queratodermia por Loricrina (Síndrome de Vohwinkel. Variantes ictiosicas, eritroqueratodermia simétrica progresiva).	604117
	KRT1	12q13	Queratina 1	AD	QPP Epidermolítica	144200
				AD	QPP Epidermolítica con placas Psoriasiformes Policiclicas.	139350
				AD	QPP no Epidermolítica difusa	139350
				AD	Ictiosis Hystrix de Curth-Macklin	146590
	KRT9	17q12-q21	Queratina 9	AD	QPP Epidermolítica	144200
	KRT6a	12q13	Queratina 6a	AD	Paquionoquia Congénita tipo I	167200
	KRT16	17q12-q21	Queratina 16	AD	QPP no Epidermolítica Focal. Paquionoquia Congénita tipo I	600962 167200
	KRT6b	12q13	Queratina 6b	AD	Paquionoquia Congénita tipo II	167210
	KRT17	17q12-q21	Queratina 17	AD	Paquionoquia Congénita tipo II	167210
	KRT5	12q13	Queratina 5	AD	Epidermolisis Bulosa Simple con QPP.	131800
KRT14	17q12-q21	Queratina 14	AD	Epidermolisis Bulosa Simple con QPP.	131800	
Desmosomal	DSP	6p24	Desmoplaquina	AD AR	QPP Estriada QPP, pelo lanoso, cardiomiopatía izquierda	148700 605676
	DSG1	18q12.1-q12.2	Desmogleina 1	AD	QPP Estriada.	148700
	PKGB	17q21	Placoglobina	AD	Sx de Naxos	601214
	PKP1	1q32	Placofilina	AD	Sx Fragilidad de la piel / Displasia Ectodérmica	604356
	EVPL	17q25	¿?Envoplaquina	AD	Tilosis con Cáncer Esofágico	148500
Unión Gap	GJB2	13q11-q12	Conexina 26	AD AD	Sx de Vohwinkel QPP con Sordera	604117 148350
	GJB6	13q12	Conexina 30	AD	Displasia Ectodérmica Hidrótica	129500
	GJB4	1p35.1	Conexina 30.2	AD	Eritroqueratodermia Variabilis	133200
	GJB3	1p35.1	Conexina 31	AD	Eritroqueratodermia Variabilis	133200
Enzimas	CTCS	11q14.1-q14.2	Catepsina C	AR AR	Sx de Papillon-Lefevre Sx de Haim-Munk	245000 245010
	TAT	16q22.1-q22.3	TirosinaTransaminasa	AR	Sx de Richner-Hanhart	276600
Proteínas	SLUR	8qter	SLURP-1	AR	Mal de Meleda	248300

Secretadas	P-1					
Mitocondrial	MTTS1	Mit7445-7516	tRNA Serina	Mito	QP con Sordera ⁵²	148350

c. QUERATODERMIA PALMOPLANTAR EPIDERMOLÍTICA

- **DEFINICIÓN E INCIDENCIA.**

Las QPP epidermolíticas (MIM 144200)³⁰, descritas por Vörner en 1901³¹ representan un subgrupo de QPP ocasionado por mutaciones en los genes KRT9 (89.2%), KRT1 (8.1%), KRT10 (1.35%) o KRT16 (1.35%). Es la forma de queratodermia más frecuente, con un patrón de herencia autosómico dominante.^{3,5,7,19,21,22} Presenta una incidencia 2.2-4.4 por 100,000 recién nacidos vivos con distribución universal, sin predominio en alguna etnia.^{5,21,29}

- **ETIOLOGÍA.**

El gen *KRT9* está localizado en 17q21.1-q21.2, consta de 8 exones, con un tamaño de 6215 pares de bases, codifica para la queratina 9 (K9) que pertenece a las queratinas tipo I. La K9 es una proteína heteropolimérica, con 623 aminoácidos, de 62064Da que se expresa exclusivamente en la capa de los queratinocitos suprabasales palmoplantares. La K9 es una queratina tipo I que se tiene que alinear con una tipo II, probablemente con la K1 para formar una espiral enrollada sobre sí misma, que luego se alinea y asocia como dos, tres o cuatro heterodímeros, para formar los filamentos intermedios.³²

El gen *KRT9* se expresa en la parte superior de los surcos epidérmicos en el centro de los surcos papilares. Los surcos papilares elevados que rebasan al surco epidérmico primario son los que reciben la mayor presión. La función de la K9 es ofrecer un reforzamiento extra en esta epidermis que está sujeta a un estrés adicional. Cuando la K9 está mutada la piel palmoplantar se vuelve anormalmente engrosada e hiperqueratósica en respuesta al estrés físico, lo cual debilita el citoesqueleto celular.³³

Las mutaciones en la K9 (*tabla 3*) generalmente afectan a la región altamente conservada 1A del dominio en barra alfa hélice de la K9, involucrado en la heterodimerización, esencial para el ensamble y estabilidad de filamentos de queratina en la epidermis de plantas y palmas.^{17,34,35} También se han reportado mutaciones en el dominio 2B del dominio en barra alfa hélice, aunque clínicamente indistinguible de las mutaciones causadas en el dominio 1A.^{16,36} La mutación R163W, que ocasiona un cambio de arginina por triptófano en el codón 163 de la secuencia del gen *KRT9* es la más comúnmente reportada en diferentes áreas geográficas, con una frecuencia de hasta 47% de los pacientes con QPP epidermolítica. Esta mutación es considerada un punto caliente mutacional por las islas CpG que contiene porque estructuralmente altera el ensamble y estabilidad de los filamentos de queratina en macrofilamentos, lo que ocasiona degeneración celular. Las mutaciones L160F, N161I y N161S, L168S están relacionadas con queratodermia asociada con almohadillas en las articulaciones,^{14,16,19,21,33,36,37,38} aunque solo se han encontrado almohadillas en dos familias con QPP con la mutación R163W.^{33,49}

La transfección de cADN de K9 mutada resulta en alteración de los filamentos de queratina con formación de gotas en las células, por lo que las mutaciones tienen un efecto dominante negativo en el ensamble de filamentos de queratina en las células.^{5,14,}

17

Tabla 3. Se muestran las 21 mutaciones reportadas en el gen *KRT9* a la fecha.⁷

Variación en la Secuencia ADN	Tipo de Variación en el ADN	Variación en la secuencia Proteica	Tipo de Variación en la Proteína	Dominio	Enfermedad Asociada	Referencia
c.469A>G	Substitución	p.Met157Val	Substitución	1A	EPPK	Hennies et al, 1994; Covello et al, 1998; Rugg et al, 2002.
c.470T>C	Substitución	p.Met157Thr	Substitución	1A	EPPK	Covello et al, 1998.
c.470T>G	Substitución	p.Met157Arg	Substitución	1A	EPPK	Shimazu et al, 2006; Zhao et al, 2008.
c.478C>G	Substitución	p.Leu160Val	Substitución	1A	EPPK	Endo et al, 1997
c.478C>T	Substitución	p.Leu160Phe	Substitución	1A	EPPK	Lu et al, 2003
c.481A>T	Substitución	p.Asn161Tyr	Substitución	1A	EPPK	Torchard et al, 1994

c.481A>C	Substitución	p.Asn161His	Substitución	1A	EPPK	Lee et al, 2003; Lin et al, 2004.
c.482A>G	Substitución	p.Asn161Ser	Substitución	1A	EPPK	Bonifas et al, 1994; Amichai et al, 2002; Tsunemi et al, 2002; Lee et al, 2003; Zhang et al, 2004; Hamada et al, 2005; Yin et al, 2007.
c.482A>T	Substitución	p.Asn161Ile	Substitución	1A	EPPK	Küster et al, 2002; Csikós et al, 2003.
c.483T>A	Substitución	p.Asn161Lys	Substitución	1A	EPPK	Reis et al, 1994
c.484C>T	Substitución	p.Pro162Ser	Substitución	1A	EPPK	Li et al, 2008
c.487C>T	Substitución	p.Arg163Trp	Substitución	1A	EPPK	Reis et al, 1994; Bonifas et al, 1994; Navsaria et al, 1995; Rothnagel et al, 1995; Yang et al, 1998; Mayuzumi et al, 1999; Morgan et al, 1999; Warmuth et al, 2000; Rugg et al, 2002; Yang et al, 2003; Lee et al, 2003; Terrinoni et al, 2004; Chiu et al, 2007.
c.488G>A	Substitución	p.Arg163Gln	Substitución	1A	EPPK	Reis et al, 1994; Kobayashi et al, 1996; Yang et al, 1998; Covello et al, 1998; Szalai et al, 1999; Rugg et al, 2002; Wennerstrand et al, 2003; Yang et al, 2003; Sun et al, 2005
c.488G>C	Substitución	p.Arg163Pro	Substitución	1A	EPPK	Kon et al, 2005
c.500_500delAinsGGCT	Indel	p.Tyr167delinsTrpLeu	Indel	1A	EPPK	He et al, 2004
c.500delAinsGGCT	Indel	p.Tyr167delinsTrpLeu	Indel	1A	EPPK	Zhang et al, 2005
c.503T>C	Substitución	p.Leu168Ser	Substitución	1A	EPPK	Rothnagel et al, 1995; Yin et al, 2007; Li et al, 2007.
c.508A>T	Substitución	p.Lys170X	Substitución	1A	EPPK	Szalai et al, 1999
c.511G>A	Substitución	p.Val171Met	Substitución	1A	EPPK	Rugg et al, 2002
c.515A>C	Substitución	p.Gln172Pro	Substitución	1A	EPPK	Hennies et al, 1994
c.1362_1363insCAC	Inserción	p.Tyr454_His455insHis	Inserción	2B	EPPK	Coleman et al, 1999
c.1372C>T	Substitución	p.Leu458Phe	Substitución	2B	EPPK	Kon et al, 2006

La QPP epidermolítica también se ha asociado con mutaciones en el gen que codifica para la queratina 1, asociada con un fenotipo más leve, distinguido solamente por la presencia de queratosis que se extiende por el tendón de Aquiles y el surco proximal del carpo. Es causada por una sustitución de nucleótido que afecta el splicing exón-intrón que ocasiona la utilización de un nuevo sitio de splice, 54 bases corriente abajo de la mutación con la subsecuente inserción de 18 aminoácidos en el dominio 2B.^{3,5,14,20,33,39}

Los factores genéticos (el sitio de expresión, el grado de cambio en el aminoácido, localización del aminoácido afectado en la secuencia de la queratina), ambientales (fricción, traumatismo local), celulares (concentración de calcio, vitamina A) y mesenquimatosos influyen en la expresión del fenotipo en las QPP.^{3,20,32,33}

- **CUADRO CLÍNICO**

Clínicamente la QPP epidermolítica inicia de los 3 a 12 meses de edad con eritema de la piel palmoplantar, posteriormente hiperqueratosis no transgrediente, gruesa, de coloración amarillo pardo, dura al tacto, que se extiende a lo largo de las caras laterales de manos y pies, hasta completarse a los 3-4 años de edad. La superficie puede ser suave o cérea, irregular o verrugosa. Existe resistencia disminuida al trauma físico lo que ocasiona descamación, vesículas y erosiones. También puede haber fisuras que siguen los surcos palmares.

Por lo general hay un borde eritematoso color rosa violáceo de 5 mm de ancho entre el dorso y la piel palmar y plantar.

En algunos pacientes se pueden presentar lesiones como almohadillas en el dorso de los dedos de las manos a nivel de las articulaciones interfalángicas proximales y distales y con menos frecuencia en los dedos de los pies que aparecen por lo general a partir de los 5 años de edad. La hiperqueratosis y las almohadillas pueden ser más severas en la mano dominante, empeoran con la fricción, el trauma local o cuando el mismo paciente se las manipula.

En pocos pacientes se puede observar clinodactilia, hiperhidrosis y niveles elevados de IgE. El curso de la enfermedad es estable, dura toda la vida, con disminución de la sensibilidad térmica y superficial, dificultad para caminar y problemas sociales.^{14,18,19,21,24,33,37,40-43}

• ALTERACIONES PATOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES

Histopatológicamente en la QPP epidermolítica se observa un agrupamiento de tonofilamentos que lleva a la vacualización perinuclear con núcleos picnóticos y gránulos basófilos y eosinófilos de tamaño variable, grandes gránulos de queratohialina con degeneración celular resultante de los estratos espinoso medio y granuloso y engrosamiento del estrato córneo. Ocasionalmente se observa formación de disqueratosis.^{14,20,21,24,29,33,39,40,41,44}

La hiperqueratosis epidermolítica no es exclusiva de la QPP epidermolítica, también se observa en otras dermatosis tanto congénitas, como adquiridas²⁹ (tabla 4).

Tabla 4. Dermatosis congénitas y adquiridas que presentan hiperqueratosis epidermolítica.

CONGÉNITAS <ul style="list-style-type: none">- Eritrodermia ictiosiforme congénita bulosa.- Nevo epidérmico tipo epidermolítico.- Acanthoma solitario epidermolítico.- Acanthoma epidermolítico diseminado.- Nevo comedónico.- Papulosis neviforme acrosiringial epidermolítica.- Queratodermia palmoplantar hereditaria tipo Vörner
ADQUIRIDAS <ul style="list-style-type: none">- Leucoplasia epidermolítica.- Queratosis actínica epidermolítica.

Ultraestructuralmente por microscopía electrónica se observan queratinocitos basales normales, mientras en la capa espinosa y granular se aprecia vacuolización del citoplasma y redes de filamentos de queratina anormales caracterizadas por la formación de un material fibrilar de forma de espiral, irregular compuesto de agregación anormal de tonofilamentos con membrana plasmática desorganizada. Hay rarefacción de desmosomas y el espacio intercelular es amplio. Las células que aparecen vacuoladas y edematosas por microscopía de luz presentan grandes áreas de citoplasma libres de filamentos con polirribosomas prominentes. Además existe expresión anormal de filagrina, loricrina, involucrina y tran glutaminasa 1 en la capa espinosa.^{24,33,40,44}

- **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la QPP epidermolítica se realiza con base en los hallazgos clínicos, histológicos, ultraestructurales o por demostración de la mutación en el gen de la K9 o K1.

El estudio molecular del gen *KRT9* puede ser por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido por secuenciación por el método de Sanger o por cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución y secuenciación.^{34,35}

El diagnóstico prenatal de QPP se puede realizar por análisis ultraestructural de biopsias de piel fetal, de células del líquido amniótico o por secuenciación del gen en muestras de vellosidades coriales. La secuenciación génica es la de mayor utilidad al detectar cambios genéticos (genotipo) más que cambios físicos (fenotipo), además de que permite obtener resultados a las 14 semanas de gestación cuando inicia la expresión de las queratinas suprabasales y no hasta después de las 19, cuando inicia la queratinización de la epidermis interfolicular para permitir su análisis ultraestructural.⁴⁵

- **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.**

Se debe realizar diagnóstico diferencial de la QPP epidermolítica principalmente con la **QPP no epidermolítica difusa o tipo Unna-Thost**, descrita por Herrmann Arthur Thost en 1880⁴⁶ y Unna en 1883.⁴⁷ Presenta un patrón de herencia autosómico dominante, caracterizada por una QPP que inicia en los primeros meses de vida, difusa, simétrica, muy gruesa, color amarillo ceroso, no transgrediente. Se puede acompañar de hiperhidrosis intensa, engrosamiento o distrofia ungueal ocasional, infecciones por dermatofitos, fisuras dolorosas, retraso mental, acro-osteolisis, encorvamiento de los dedos y clinodactilia. Tiende a empeorar en la tercera década de la vida y en invierno.⁴²

La enfermedad de Unna Thost es causada por mutaciones en el gen *KRT1* que codifica para la K1, por deleciones del dominio en barra, o mutaciones puntuales en el dominio 1B, 2B, V1, V2.^{14,43} Clínicamente es indistinguible de la tipo Vörner e histológicamente no presenta epidemolisis. Es necesario realizar múltiples biopsias para poder demostrar los cambios epidermolíticos, ya que reexaminación de la familia originalmente descrita por Thost mostró la clásica QPP epidermolítica y se demostró que no era la QPP más frecuente como antes se reportaba. Además se debe de realizar diagnóstico diferencial con las QPP descritas en la *tabla 2*.^{3,16,20,24,25,33,48-50}

- **TRATAMIENTO**

Como para la mayoría de las enfermedades genéticas no existe tratamiento curativo para la QPP sólo medidas paliativas tendientes a disminuir los principales síntomas. Se recomienda evitar traumatismos y tomar baño caliente jabonoso para disminuir la capa córnea.

El tratamiento farmacológico tópico con ácido salicílico al 4-6% en vaselina; propilenglicol al 35-70% en agua bajo oclusión con plástico por las noches; cremas con ácido láctico y urea; antibióticos, en caso de infecciones secundarias; el tratamiento sistémico es a base de retinoides orales, como la acitretina o desbridamiento mecánico con hoja de bisturí.^{1,3,4,21,23,29,40,42}

Como ya se mencionó, la mayoría de los desórdenes de las queratinas son causados por mutaciones dominantes negativas, por lo que existen problemas para desarrollar terapia génica, ya que se necesita remover o inhibir la expresión del gen mutado sin afectar el gen normal, o por la sobreexpresión del alelo normal.^{1,4,5}

Estudios en ratones transgénicos, sugieren que el efecto de la queratina mutada podría superarse al incrementar la expresión de la proteína normal. Otras líneas de investigación involucran blancos hacia el ADN o ARN mutado para disminuir o detener la expresión del gen mutado. Los quimeroplastos (oligonucleótidos de ADN o ARN), se usan experimentalmente para la terapia génica para desórdenes dominantes, son capaces de corregir las mutaciones puntuales únicas, sin que se conozca el mecanismo exacto. También el uso de ribozimas para específicamente cortar las secuencias de ARNm o ARNsi corto inhibitorio para desactivar el ARN mutado. Otra terapia génica en experimentación dirigida hacia el ARN, es el splicing trans ARN mediado por espliceosoma.⁴

Chaperonas químicas como la N-óxido trimetilamina (TMAO), restauran la función normal de las proteínas mutadas, porque reduce la formación de agregados de queratina en respuesta choque hipertónico.⁴

Se ha identificado una asociación entre la QPP y el riesgo de desarrollar cáncer de esófago, colon, mama, ovario y melanoma, por lo que se sugiere dar seguimiento a los pacientes. En caso que se presenten síntomas, ya que sólo se han reportado pocos casos en la literatura y no existe una asociación clara entre QPP y el riesgo de neoplasias, o tal vez se localice un gen tumor supresor presente en la región 17q21.^{26,50,51}

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Con el advenimiento de la medicina molecular, además de realizar el diagnóstico clínico, químico o anatomopatológico de alguna enfermedad es importante conocer el defecto genético que originó dicha patología.

Las queratodermias palmoplantares hereditarias son un grupo de genodermatosis raras. En particular, la queratodermia palmoplantar epidermolítica es una enfermedad hereditaria causada por mutaciones en el gen *KRT9*, que codifica para la queratina 9. La queratina 9, es una proteína expresada solamente en palmas y plantas cuya función principal es estructural, para proteger a las células epiteliales del estrés mecánico. La mayoría de las mutaciones descritas a la fecha en el gen *KRT9* son en el exón 1, el cual es considerado un punto caliente mutacional y codifica para el dominio 1A del dominio en barra de la queratina 9, muy importante en la función estructural de la proteína. Aunque el gen es grande, el hecho de que la mayoría de las mutaciones sean en un sólo exón, lo hace un blanco para diagnóstico molecular.

Aunque desde el año de 1994 se conocen los defectos moleculares de las queratodermias palmoplantares epidermolíticas, en México no existen estudios a la fecha en familias mexicanas afectadas que determinen el defecto molecular en el gen *KRT9*.

Las mutaciones reportadas en el gen *KRT9* no tienen una distribución geográfica en particular, por lo que es importante conocer que mutaciones son las que se presentan en la población mexicana.

Por lo que en el presente estudio se presenta una familia afectada con las características clásicas e histopatológicas de QPP epidermolítica con 14 miembros afectados en 4 generaciones, a la que se le realizó el análisis molecular del gen *KRT9* para confirmar el diagnóstico y conocer el tipo de mutación.

IV. OBJETIVOS.

En el presente estudio se plantean los siguientes objetivos:

- Caracterizar las manifestaciones clínicas de la queratodermia palmoplantar epidermolítica de los pacientes que asisten a la clínica de genodermatosis del Hospital General de México.
- Estudio molecular del gen *KRT9* en familias mexicanas con queratodermia palmoplantar epidermolítica.
- Conocer las mutaciones en el gen *KRT9* causantes de queratodermia palmoplantar epidermolítica.
- Establecer si existe relación genotipo-fenotipo.
- Otorgar asesoramiento genético completo a los pacientes con queratodermia palmoplantar epidermolítica.

V. HIPÓTESIS

La queratodermia palmoplantar epidermolítica es causada por mutaciones en el dominio 1A de la queratina 9.

VI. DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Tipo de investigación:

Se trata de un estudio descriptivo, observacional de casos clínicos.

2. Universo:

Se convocó al estudio a casos familiares identificados clínicamente con queratodermia palmoplantar que acudieron a la consulta de genodermatosis del Hospital General de México.

3. Criterios de Selección:

- a. Criterios de inclusión: pacientes que acudieron a la consulta de la clínica de genodermatosis del Hospital General de México con el diagnóstico de queratodermia palmoplantar epidermolítica, confirmada por estudio histopatológico.
- b. Criterios de exclusión: pacientes que no aceptaron ingresar al estudio y a los que presentaban queratodermia palmoplantar no epidermolítica.
- c. Criterios de Eliminación: pacientes en los que no se pudo realizar valoración clínica y estudio histopatológico.

4. Variables del estudio:

- a. Dependiente: tipo de mutación encontrada.
- b. Independiente: pacientes con queratodermia palmoplantar epidermolítica.

VII. MÉTODO

a. Pacientes

En el periodo de tiempo establecido se captó a cuatro familias con QPP: 1 con QPP epidermolítica y 3 con QPP no epidermolítica. Por lo que sólo se ingresó a una familia al estudio.

A los pacientes afectados y sanos que aceptaron ingresar al estudio se les realizó historia clínica completa, árbol genealógico, historia natural de la enfermedad, descripción histológica de biopsia de piel palmar o plantar y toma de muestra de sangre periférica para estudio molecular.

b. Estudio Molecular del Gen *KRT9*

▪ Extracción de sangre periférica:

Se extraen de forma aséptica 5 ml de sangre periférica y se coloca en un tubo de ensayo con EDTA. Posteriormente se identifica la muestra con el nombre completo del paciente, diagnóstico y número de caso.

▪ Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN de leucocitos en sangre periférica se sigue la técnica de Kempter y Grossbadern⁵³ como se describe a continuación:

- Transferir 1-3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10 mM, pH 7.6; Tritón 1%; Sacarosa 300 mM).
- Centrifugar a 3000 rpm/6 minutos y decantar el sobrenadante.
- Agregar 1 ml de amortiguador TTS. Agitar para resuspender el botón y pasar a un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
- Centrifugar a 10,000 rpm/2 min. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS y resuspender.

- Centrifugar a 10,000 rpm/2 min. Repetir de dos a tres veces el paso anterior hasta que el botón se vea blanco.
- Agregar 570µl NaCl 5mM. Agitar 2 minutos. Agregar 30µl SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%. Agitar 5 minutos.
- Agregar 200µl NaCl saturado. Agitar 10 minutos.
- Centrifugar a 10,000 rpm/30 minutos a 4°C.
- Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100 mm estéril.
- Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN.
- Tomar el ADN con una varilla de vidrio, enjuagar el ADN con etanol al 70%. Dejar evaporar el etanol en condiciones estériles. Resuspender el ADN en 350µl de agua estéril. Colocar en baño maría a 60°C/2 horas.
- Verificar calidad del ADN en gel de agarosa al 0.8%.

- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Es una técnica molecular para la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN.

Para que la región codificante (exón) sea secuenciada en su totalidad, los oligonucleótidos deben ser tomados desde la región no codificante (intrón). Típicamente un oligonucleótido mide de 15 a 25 pares de bases, entre más largo, más especificidad y homología con el gen deseado tiene. A más pares de bases, más temperatura de alineación se necesita, y la taq polimerasa podría no funcionar correctamente. Es por esto que se diseñaron los oligonucleótidos con 21 pares de bases.

Los oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del exón 1 del gen *KRT9* (anexo 2) para la reacción de PCR son los siguientes:

Forward (5'-3'):	GACCAAGACAGAGACAGTTTC
Reverse (5'-3'):	CTCCTATCACTGCTTCTCAAC

- Se toma una parte de la secuencia del intrón del gen *KRT9* al azar, de aproximadamente 20 pares de bases. De ser posible, la región elegida debe contener la misma cantidad de AT que de GC.

- Se utiliza la base de datos NCBI, cuyo encabezado “blast” permite escanear el genoma. De esta forma, la base de datos indica que homología existe entre la secuencia elegida con alguna otra secuencia del genoma.

- Se eligieron las secuencias que tenían casi nula homología con otra región que no perteneciera al gen *KRT9*.

Los oligonucleótidos llegan liofilizados y se hidratan con agua inyectable estéril. Se llevan a una concentración de 100mM con base a la concentración de nanomoles que marca la etiqueta del proveedor.

Para la amplificación del exón 1 del gen *KRT9* se toman 200µl de ADN genómico del paciente con 0.12µl de oligonucleótido forward, 0.12µl de oligonucleótido reverse, 3µl dNTP's, 3µl Buffer con MgCl₂ al 10µM y 0.1µl de TaqPolimerasa aforado a 30µl con H₂O destilada.

Posteriormente se coloca la muestra en un termociclador con las siguientes condiciones:

<i>Número de Ciclos:</i>	25 ciclos.
<i>Temperatura inicial:</i>	94°C / 5 minutos
<i>Desnaturalización:</i>	94°C / 1 minuto
<i>Alineamiento:</i>	58°C / 1.5 minutos
<i>Elongación:</i>	72°C / 2 minutos
<i>Extensión:</i>	72°C / 2 minutos

Posterior a la PCR, para observar los productos obtenidos se realizó la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, para que el ADN migre en base a su carga y peso al aplicarse un campo eléctrico. Esta técnica permite visualizar la cantidad de la muestra, así como la presencia o ausencia de ARN contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada.

La banda con el producto de interés en el gel de agarosa es cortada y se purifica con el método de purificación de PCR rápida Quiaex II (Química Valaner cat No. 20051) para remover ADN contaminante de la muestra (ADN bacteriano) y reactivos procedentes de la purificación o de otros procesos previos (oligonucleótidos, nucleótidos restantes de la PCR).

- Secuenciación:

En un tubo de 200µl se colocan 2.0µl de mezcla de reacción “BigDye Terminador”, 1µl templado de producto de PCR (100ng/µl), 1µl de oligonucleótido y 16µl de H₂O destilada. La muestra se coloca en un termociclador con las siguientes condiciones:

<i>Número de Ciclos;</i>	25 ciclos.
<i>Temperatura inicial:</i>	94°C / 5 minutos
<i>Desnaturalización</i>	96°C / 30 segundos
<i>Alineamiento:</i>	50°C / 15 segundos
<i>Elongación:</i>	60°C / 4 minutos
<i>Extensión:</i>	72°C / 7 minutos

El producto obtenido se purifica por el método por columnas Centri Sep (Parte No. 401262 Applied Biosystems) para eliminar los ddNTPs marcados por fluorescencia presentes en exceso, permitir una secuencia limpia y evitar errores en la interpretación de resultados. Luego se seca en un concentrador de vacío, se añaden 20µl de amortiguador de carga TSR [Template Supression Reagent (Applied Biosystem)], se transfiere a un tubo de secuenciación, se coloca una septa y se desnatura a 90°C/2 min. Finalmente, se colocan las muestras en el secuenciador automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico no es necesario para este tipo de estudio.

IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Se realizó una carta de consentimiento informado para los pacientes para participar en el estudio (anexo 1), en donde se informó a los pacientes o a sus padres, si eran menores de 18 años de edad de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, de los objetivos del estudio de una manera clara y detallada y los riesgos existentes en la toma de muestra de sangre. El riesgo de toma de sangre se considera menor al mínimo.

temperatura, fisuras en época de frío y aparición de lesiones queratósicas en la piel que cubren las articulaciones interfalángicas proximales y distales a la edad de 1.5 años.

A la exploración dermatológica presenta dermatosis diseminada en manos y pies caracterizada por la presencia en palmas de queratosis difusa, amarilla, de consistencia dura, con bordes irregulares con algunas fisuras (*Figura 7A y B*), no transgrediente, con borde eritematoso en esta región que no rebasa el primer pliegue anterior del carpo (*Figura 7D*); en dorso de las manos presenta almohadillas en las articulaciones interfalángicas distales y proximales (*Figura 7C*); en plantas de los pies presenta queratodermia difusa, color amarillo, de consistencia dura, con descamación (*Figura 7E*), no transgrediente, con borde eritematoso (*Figura 7F*); en dorso de los dedos de los pies no presenta almohadillas.





Figura 7. Fotos clínicas del paciente V-3 donde se aprecia (A y B) queratodermia difusa en palmas de ambas manos; (C) almohadillas en el dorso de las articulaciones interfalángicas distales y medias de la mano izquierda; (D y F) borde eritematoso, con queratodermia no transgrediente y (E) queratodermia difusa, con descamación en planta del pie izquierdo.

El servicio de dermatología realiza toma de biopsia de la piel de la palma de la mano izquierda, reportándose hiperplasia epidérmica digitada, en asociación con marcada hipergranulosis, cuerpos eosinofílicos y basofílicos de forma homogénea pero de tamaños irregulares, células vacuoladas en la porción alta de la epidermis y marcada ortoqueratosis (*figura 8*).

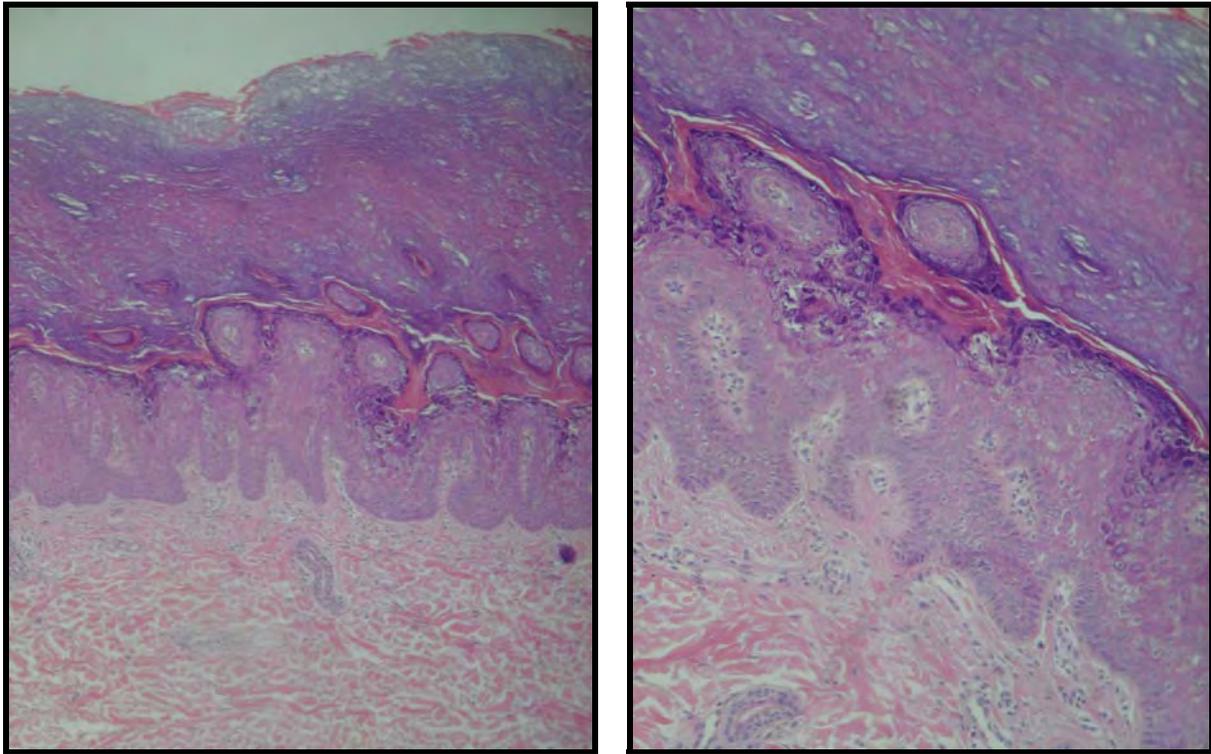


Figura 8. Histología de la piel palmar del paciente V-3.

La exploración física del resto de los familiares afectados presenta hallazgos clínicos similares al probando, sin relación al sexo o a la edad, con excepción que los casos de mayor edad tienen manifestaciones más severas, incluyendo almohadillas de mayor tamaño y también en el dorso de los dedos de los pies.

Los datos familiares, clínicos y anatomopatológicos del paciente V-3 sugieren que se trata de una queratodermia palmoplantar epidermolítica. Se realizó el estudio molecular del exón 1 del gen *KRT9*.

La familia en estudio presenta 14 individuos afectados con QPP epidermolítica, de los cuales 12 aceptaron ingresar al protocolo. 1 familiar sano también se incorporó al estudio. Los estudios moleculares del resto de los familiares se encuentran en proceso.

Posterior a la reacción en cadena de la polimerasa se realiza electroforesis del producto de PCR para comprobar el tamaño del producto esperado, que es de 708 pares de bases (*figura 9*).

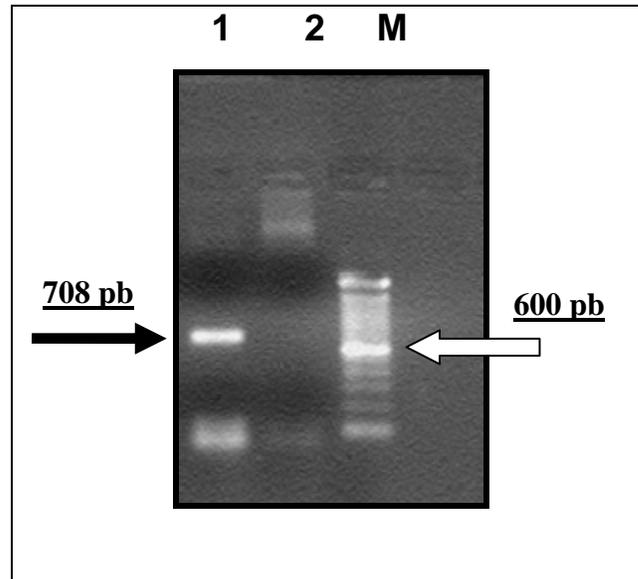


Figura 9. Fotografía del gel de agarosa en el que se observa el producto de PCR del fragmento del ADN de interés, de 708 pares de bases (pb) (flecha negra). 1. Paciente V-3, 2. Blanco, M. Escalera de peso molecular para referencia, la flecha blanca indica 600 pb.

El estudio de secuenciación del paciente V-3 mostró una mutación heterocigota de tipo transición, un cambio de Citosina por Timina en el codón 163, lo que a nivel proteico cambia una arginina (R) por triptófano (T) (R163W), un aminoácido polar por uno no polar (*figura 10*).

Los dominios de la proteína de la queratina 9, están codificados por 623 residuos aminoácidos, el residuo 1-153 codifica para el dominio de la cabeza; **del 154-188 para el 1A**, del 189-200 para el L1, del 201-301 para el 1B, del 302-317 para el L12, del 318-336 para el 2A, del 337 al 344 para el L2, del 345 al 465 para el 2B y del 466 al 623 para el tallo. Por lo tanto, la mutación encontrada en el paciente V-3, se encuentra en el residuo 163, en el dominio 1A.

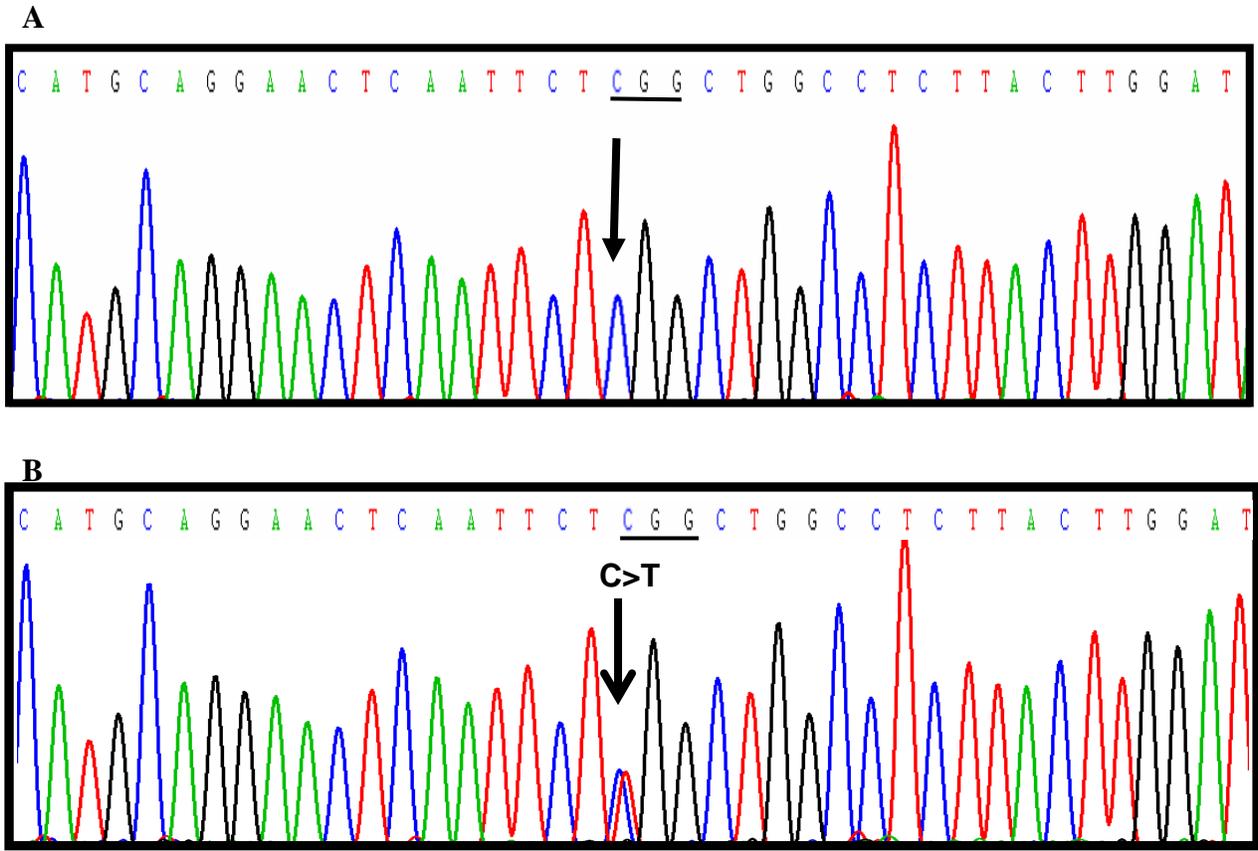
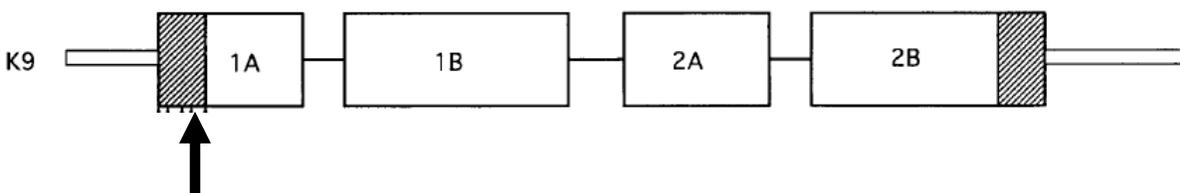


Figura 10. Electroferogramas: A) Control con secuencia CGG en el codón 163. B) Paciente V-3, en el que se observa una mutación heterocigota en el codón 163, cambio de Citocina (C) por Timina (T).

El dominio en barra presenta repetidos tipo héptada, muy importantes para las funciones de dimerización y estabilidad de la K9. Los primeros 7 a 13 residuos son muy importantes para la estabilidad del filamento intermedio. La mutación R163W cambia un residuo polar por uno no polar en el 11^o residuo, el *d* de la héptada, implicado en la estabilidad del filamento intermedio por medio de uniones hidrofóbicas.

En el siguiente esquema de la estructura de la K9 se señala el sitio de la mutación R163W del paciente V-3.



XI. DISCUSIÓN

El sistema de filamentos de queratina mantiene la integridad estructural de los tejidos epiteliales, sin los cuales las células se vuelven frágiles y propensas a ruptura después de un trauma físico leve.

La queratodermia palmoplantar epidermolítica es una genodermatosis causada por mutaciones en el gen *KRT9*. Se han reportado 21 mutaciones en este gen, todas se presentan en los residuos que codifican para el dominio en barra alfa-hélice de la queratina, de las cuales 19 son en el dominio 1A y 2 en el dominio 2B, lo que muestra la importancia de estos dominios en la estabilidad de la fibra de queratina. Decidimos iniciar el estudio de la familia con QPP epidermolítica analizando el exón 1 del gen *KRT9*, porque es considerado un punto caliente mutacional.

El paciente estudiado presentó una mutación heterocigota en el residuo 163 del gen *KRT9* como se planteó inicialmente. Esta mutación provoca el cambio de Citocina por Timina, que a nivel proteico cambia un residuo polar (arginina) por uno no polar (triptófano), designada R163W. El residuo 163 se encuentra en el dominio 1A del dominio en barra alfa hélice. Los residuos en las posiciones 7-16 del segmento 1A son críticos para la estabilidad del filamento intermedio. El residuo de arginina en la posición 163 de la K9 ocupa la posición *d* del repetido héptada, es el 11^o residuo del dominio 1A, por ser polar, se encarga de estabilizar la formación del dímero a través de efectos hidrofóbicos. Los polipéptidos de queratina mutados no se pueden dimerizar además de actuar en forma dominante negativa con los polipéptidos normales, lo que ocasiona que se acumulen de forma anormal sin que se pueda formar de manera correcta el filamento intermedio. A nivel fenotípico se presenta como hiperqueratosis palmoplantar con una fragilidad aumentada al trauma.^{18,19,33}

La arginina es un aminoácido altamente conservado en el dominio 1A, es el sitio más común de mutaciones en todas las enfermedades de la queratinización, lo que refleja la

importancia de la región amino terminal del dominio en barra para mantener las interacciones hélice-hélice normales en las queratinas.²⁴

De acuerdo a las nuevas versiones de la secuencia de queratina 9 publicada después del 23 abril de 2005 [GI: 55956898] una treonina en la posición 12 en la versión anterior fue cambiada a serina y arginina, por lo que nuestra secuenciación se basa en esta corrección. La mutación R162W fue redefinida a R163W.³³

De las 21 mutaciones reportadas, la mutación R163W se presenta en un 47% de los pacientes con queratodermia palmoplantar epidermolítica. Esta sustitución es un cambio no conservativo, consistente con la deaminación del CpG metilado, lo que ocurre en más del 90% de las mutaciones puntuales humanas. La mutación R163W es considerada un punto caliente mutacional, por lo que en todo paciente con QPP epidermolítica en estudio molecular se debe buscar en primera instancia esta mutación.^{24,41}

Las QPP son un grupo heterogéneo de enfermedades, no solo causadas por mutaciones en genes de las queratinas ya que se han reportado incluso mutaciones en el genoma mitocondrial. Es muy importante al inicio del estudio del paciente con QPP definir si su padecimiento es hereditario o adquirido, focal o difuso y si se acompaña de otras manifestaciones sistémicas para poder integrar un diagnóstico correcto y así detectar el defecto molecular subyacente.

La QPP epidermolítica se debe diferenciar de la QPP no epidermolítica, fenotípicamente son muy similares. La QPP no epidermolítica es causada por mutaciones en el gen *KRT1*, por esta razón fueron excluidas tres familias de nuestro estudio. La QPP no epidermolítica presenta una QPP más severa, con fragilidad al trauma aumentada, hiperhidrosis, disqueratosis ungueal y un mayor riesgo de infecciones locales que las QPP causadas por mutaciones en el gen *KRT9*.

La presencia de almohadillas en el dorso de las articulaciones de los dedos de manos y pies en algunos pacientes es característico y único de las QPP epidermolíticas causadas por mutaciones en el gen *KRT9*. Diversos estudios cuestionaban si las almohadillas en estos pacientes solo eran una asociación con la QPP epidermolítica, pero en un estudio reciente con RT-PCR cuantitativa de biopsia de piel de las almohadillas reveló un incremento de 90 veces la expresión de *KRT9*, lo que sugiere que el fenotipo de las almohadillas es por una expresión ectópica de K9.⁴⁹ Las mutaciones asociadas a este fenotipo son las L160F, N161I y N161S.^{14,16,19,20,33,36} En la literatura mundial sólo se han reportado dos familias con almohadillas en los nudillos con la mutación R163W.^{33,49} Los resultados del estudio molecular en el paciente estudiado, concuerdan con lo reportado en la literatura, lo que indica que es la tercera familia con la mutación R163W en el gen que codifica para la queratina 9 asociada con almohadillas en los nudillos.

La mutación R163W en el gen *KRT9* presenta una distribución universal, sin predominio en alguna región geográfica o etnia, ya que hay casos reportados en Japón, China, Estados Unidos, Europa e incluso en hispanos.⁵⁴

Por ser una genodermatosis, no existe actualmente tratamiento curativo para la QPP solo sintomático. El tratamiento con retinoides orales disminuye la proliferación de los queratinocitos en la piel palmoplantar, disminuyendo en forma importante la queratosis, pero por los efectos adversos, el potencial teratogénico y su elevado costo lo hacen una alternativa poco accesible para nuestros pacientes.

La QPP epidermolítica presenta un patrón de herencia autosómico dominante, por lo que la descendencia de un afectado es de 50% de probabilidad de tener un hijo con QPP y 50% de tener un hijo sano, sin predominio de sexo. Eso es lo que hemos aprendido clásicamente, curiosamente, en las 4 familias analizadas con QPP se observa que las mujeres afectadas tienen más probabilidades de tener un hijo afectado que los hombres, como se presenta en el árbol genealógico del paciente reportado en este trabajo: el primer hijo de las mujeres esta afectado, mientras el único hombre que

tiene descendencia su hijo, esta sano. Probablemente en mujeres exista una mayor predisposición para que segregue el alelo mutado durante la meiosis o el óvulo con el alelo mutado tenga una ventaja selectiva para ser fecundado o en el hombre puede que el espermatozoide sin alelo mutado tenga una ventaja selectiva para fecundar. La pregunta queda vigente. Se requieren estudios con un número significativo de pacientes para poder analizarlo mejor.

Los casos más severos en la misma familia podrían explicarse por una segunda mutación en el mismo gen u otra agregada en otro gen de la queratina, como se ha reportado en los casos de ictiosis ligada al X severa que presentan mutación tanto en el gen STS como en el gen de la filagrina implicado en la ictiosis vulgar.

Debemos de cambiar el concepto de que las QPP son causadas únicamente por mutaciones en genes de queratinas. Existen otros genes implicados en las funciones de estabilidad y dinámica de los filamentos intermedios en las células epidérmicas. Es importante una buena semiología y exploración física, para poder realizar un diagnóstico molecular correcto.

XII. CONCLUSIONES

Las QPP son un grupo heterogéneo de enfermedades que presentan engrosamiento de la piel palmar y plantar.

Las QPP pueden ser hereditarias y adquiridas. Las QPP hereditarias son causadas por defectos en diversos genes principalmente las queratinas.

La QPP epidermolítica es la QPP más frecuente, ocasionada por mutaciones en el gen *KRT9* que codifica para la queratina 9. La mutación R163W se presenta en un 47% de los pacientes y es considerada un punto caliente mutacional con una distribución panétnica.

Las almohadillas en los nudillos son ocasionadas por mutaciones en el gen *KRT9* y son exclusivas de la QPP epidermolítica.

Aún no existe tratamiento curativo para las QPP, solo sintomático.

No se conoce todavía el mecanismo exacto de varias de las funciones de las queratinas. Estudios futuros nos revelarán cómo llevan a cabo estas funciones, cuya aplicación beneficiará a todos los pacientes con QPP.

El conocimiento de las mutaciones causantes de las QPP es indispensable para poder elaborar una terapia génica efectiva.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1.

Formato 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

Servicios participantes:

- **Genética**
- **Dermatología**

Yo _____ otorgo mi consentimiento para que me sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación **“Estudio Molecular del Gen *KRT9* en una Familia Mexicana con Queratodermia Palmoplantar Epidermolítica”**. Se me ha explicado que la enfermedad llamada Queratodermia Palmoplantar, es causada por una alteración genética que ocasiona engrosamiento de la piel de las palmas y plantas desde el primer año de vida y que por medio de estudios de nuestro material genético se pueden conocer las alteraciones que dieron origen al padecimiento.

Se me ha explicado con detenimiento que mi participación consiste en que me sean extraídos con jeringa 3 ml de sangre venosa, procedimiento que no ocasionará molestias mayores; sólo pudiera presentarse la formación de un pequeño moretón en el área puncionada. Además, se nos ha asegurado que la información obtenida en este estudio y relacionada con nuestro patrimonio genético no será divulgada ni usada para otros fines que no sean los establecidos en el proyecto de investigación mencionado y si por alguna razón decidiera retirarme del estudio, esto no demeritará la calidad de mi atención.

ATENTAMENTE

Nombre y firma del paciente o padre o tutor

Nombre y firma del médico responsable

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

México, D.F. a ____ de _____ de 20__.

tgccaaggtggggcacaggaagctttgcagcccaggagtggggaagaagaggagttatgatgtagcatccctctaaagccttctcctaacccttag
aaagcagctctggagaagagcttgaagacacgaagaaccgctactgtggccagctgc

EXON 6 224 bp

ccagctccggcacggtgtccaggagttggagattgagctgcagctcagctcagcaaggttgtagttctgctatagaccctttgccaaggtggggca
caggaagctttgcagcccaggagtggggaagaagaggagttatgatgtagcatccctctaaagccttctcctaacccttag**AAAGCAGCTCT**
GGAGAAGAGCTTGAAGACACGAAGAACCGCTACTGTGGCCAGCTGCAGATGATCCAGGAGCAG
ATCAGTAACTTGGAGGCCAGATCACTGACGTCCGGCAAGAGATCGAGTGCCAGAATCAGGAATA
CAGCCTTCTGCTCAGCATTAAAGATGCGGCTGGAGAAGGAAATCGAGACCTACCACAACCTCCTTG
AGGGAGGCCAGGAAGACTTgtaggtccccaggatttggtggaaccctgggggtccctaggcctctgatactacttctgtccctctgga
tagaggcagctgggggaagttctatacacagggtcttatgggtgaggactcttcatcctgggggcccgggggacctcagtgcatthggctttggg
aaaggagat

EXON 7 518 bp

cacagctcagctggaggtctcctcctcccagctgtggtgcccgccagactctgtcctctgcctcccaggaaggaaaacagaaagattcatgtttgg
gtcctgactctgtccaggtccatcctcatatagtgtatggggccgctcatttaactctctgttttcttcttcttag**TGAATCCTCCGGAGCTG**
GAAAAATTGGCCTTGGAGGTCGAGGAGGAAGTGGAGGCAGTTATGGAAGAGGATCCAGGGGAGG
AAGTGGAGGCAGCTATGGTGGAGGAGGAAGTGGAGGTGGCTATGGTGGAGGAAGTGGGTCCAGG
GGAGGAAGTGGAGGCAGCTACGGTGGAGGAAGTGGTTCTGGAGGAGGTAGTGGAGGTGGCTATG
GTGGAGGAAGTGGAGGTGGCCATAGCGGAGGAAGTGGAGGTGGTCATAGTGGAGGAAGTGGGG
GCAACTATGGAGGAGGAAGTGGCTCTGGAGGAGGAAGTGGGGGTGGCTATGGTGGAGGAAGTGG
GTCCAGGGGAGGAAGTGGAGGCAGCCATGGTGGAGGAAGTGGTTTTGGAGGTGAAAGTGGAGGC
AGCTACGGAGGCGGTGAAGAAGCGAGTGGAAAGTGGTGGCGGCTACGGAGGAGGAAGCGGAAAA
TCATCCATTCTAGTCTTCTCCTCAAAATCTGGTGACCAAGATGAGACAAAAGtaagggacaatcctaggt
tgtgggtggagagtagtcaaggtctcacctttttttttttgagtttttgaatctctggggaacacagattctgaatagagctagatgttagggaaatcctag
tgaggtgtcagagacctaccctgttctgaattgatcattttttgacagagcc

EXON 8 309 bp

gaatagatggggaccagtagattgggagaccccagggtccttctacctcaggattgtccagctctttgagctctagtgcttgcctcgagttccccatc
ttcccccaagtcccaacctctgtctcctgttacagctcctccctctccccctcatctccctccatctctccacag**GCTTCCTTTTCGCGATACT**
AGAGCCTCTGTAAACTTCTCCTGCCAGCCCCAGCTGAGCATCCCCAGATGGGCAGACTCCCGATG
AAGCCTGCTTATTGGATCCTGACATCAGGAATAGCTGGCAACAAGCCCCTGTGCCCGTTTGGGACTG
AACTGACTTGGCATATGTGCCTCTGGCTTTCCATTGGCTTCCAACCCTGCTTGGCTTTGATGCCTTCA
GGTTGGGGAGACAGACCTTTTCTCTCTCTGGCCTGGGGTGGCTCTCACACCCTGCACGATCTTGA
CTATAATAAAGCTTCCCTACTGCaatcaaactcagactttgaccattgttctttgggattaagaagggataggggtgggtgggacac
agtagctcatgtttgtaatcctagcactttgggaggctgagacaggaggatcacttgaggccaggagttcaagactagcttgagcaacatagtgaga
cctgtctttacaaaaaa

XIV. REFERENCIAS.

1. Ratnavel RC, Griffiths WA. The inherited palmoplantar keratodermas. *Br J Dermatol.* 137(4):485-490 (1997).
2. Itin, PH and Fistarol, SK. Palmoplantar Keratodermas. *Clin Derm.* 23:1, 15-22 (2005).
3. Albers, KM. Keratin Biochemistry. *Clin Derm.* 14:309-320 (1996).
4. Rugg EL, Leigh IM. The Keratins and Their Disorders. *Am J Med Gen Part C (Semin. Med. Genet.).* 131C:4–11 (2004).
5. Irvine AD. Inherited Defects in Keratins. *Clin Derm.* 23:6-14 (2005).
6. Plowman JE. The proteomics of keratin proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 849(1-2):181-189 (2007).
7. Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum. Mutat.* 21;29(3):351-360 (2008). (www.interfil.org)
8. Fuchs E. Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:123-153 (1995).
9. Lu H, Hesse M, Peters B, Magin TM. Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol.* 84(8):709-718 (2005).
10. Gu LH, Coulombe PA. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol.* 19(1):13-23 (2007).
11. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 10;313(10):2021-2032 (2007).
12. Uitto J, Richard G, McGrath JA. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp Cell Res.* 313(10):1995-2009 (2007).
13. Sano T, Kume T, Fujimura T, Kawada H, Higuchi K. Keratin alterations could be an early event of wrinkle formation. *J Derm Sci.* 53(1): 77-79 (2009).
14. Kimyai-Asadi A, Kotcher LB, Jih MH. The Molecular Basis of Hereditary Palmoplantar Keratodermas. *J Am Acad Dermatol.* 47:3, 327-346 (2002).
15. Tanaka S, Miura I, Yoshiki A, Kato Y, Yokoyama H, Shinogi A, Masuya H, Wakana S, Tamura M, Shiroishi T. Mutations in the helix termination motif of mouse type I

IRS keratin genes impair the assembly of keratin intermediate filament. *Genomics*. 90(6):703-711 (2007).

16. Paller AS. The molecular bases for the palmoplantar keratodermas. *Pediatr Dermatol*. 16(6):483-486 (1999).
17. Kobayashi S, Tanaka T, Matsuyoshi N, Imamura S. Keratin 9 Point mutation in the Pedigree of Epidermolytic Hereditary Palmoplantar Keratoderma Perturbs Keratin Intermediate Filament Network Formation. *FEBS letters*. 386:149-155 (1996).
18. Rothnagel JA, Wojcik S, Liefer KM, Dominey AM, Huber M, Hohl D, Roop DR. Mutations in the 1A domain of keratin 9 in patients with epidermolytic palmoplantar keratoderma. *J Invest Dermatol*. 104(3):430-433 (1995).
19. Lu Y, Guo C, Liu Q, Zhang X, Cheng L, Li J, Chen B, Gao G, Zhou H, Guo Y, Li Y, Gong Y. A novel mutation of keratin 9 in epidermolytic palmoplantar keratoderma combined with knuckle pads. *Am J Med Genet A*. 120A(3):345-349 (2003).
20. Mayuzumi N, Shigihara T, Ikeda S, Ogawa H. R162W Mutation of Keratin 9 in a Family with Autosomal Dominant Palmoplantar Keratoderma with Unique Histologic Features. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 4(2):150-2 (1999).
21. Bologna JL, Jorizzo JL and Rapin RP. *Dermatología*. Vol 1. Ed. Mosby. España, pp 809-821 (2004).
22. Kelsell DP, Stevens HP. The palmoplantar keratodermas: much more than palms and soles. *Mol Med Today*. 5(3):107-13 (1999).
23. Braun-Falco M. Hereditary Palmoplantar Keratodermas. *J Dtsch Dermatol Ges*. Apr 1-13 (2009).
24. Navsaria HA, Swensson O, Ratnavel RC, Shamsheer M, McLean WH, Lane EB, Griffiths D, Eady RA, Leigh IM. Ultrastructural changes resulting from keratin-9 gene mutations in two families with epidermolytic palmoplantar keratoderma. *J Invest Dermatol*. 104(3):425-299 (1995).
25. Gamborg Nielsen P. Two different clinical and genetic forms of hereditary palmoplantar keratoderma in the northernmost county of Sweden. *Clin Genet*. 28(5):361-366 (1985).
26. Mozzillo N, Nunziata CA, Caracò C, Fazioli F, Botti G; Melanoma Cooperative Group. Malignant melanoma developing in an area of hereditary palmoplantar keratoderma (Mal de Meleda). *J Surg Oncol*. 84(4):229-233 (2003).
27. Kabashima K, Sakabe J, Yamada Y, Tokura Y. "Nagashima-type" keratosis as a novel entity in the palmoplantar keratoderma category. *Arch Dermatol*. 144(3):375-379 (2008).

28. Parmentier L, Steijlen PM, van Steensel MA. Recessive palmoplantar keratodermas: a fertile biological hunting ground. *Arch Dermatol.* 144(3):384-385 (2008).
29. Moreno GJC, Ortega RM y Quintana del OJ. Queratodermias Palmoplantares. *Piel.* 3:363-371 (1988).
30. #144200, Palmoplantar Keratoderma, Epidermolytic; EPPK. OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=144200>.
31. Vorner, H. Zur Kenntniss des Keratoma hereditarium palmare et plantare. *Arch. Derm. Syph.* 56:3-31 (1901).
32. Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K. Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol.* 112(4):483-488 (1999).
33. Chiu, CH, Jee, SH, Sheen, YS, Chu, CY, Lin, PJ. and Llaw, SH. Mutation of Keratin 9 (R163W) in a Family with Epidermolytic Palmoplantar Keratoderma and Knuckle Pads. *J Derm Science.* 45: 63-65 (2007).
34. Rugg EL, Common JE, Wilgoss A, Stevens HP, Buchan J, Leigh IM, Kelsell DP. Diagnosis and confirmation of epidermolytic palmoplantar keratoderma by the identification of mutations in keratin 9 using denaturing high-performance liquid chromatography. *Br J Dermatol.* 146(6):952-957 (2002).
35. He XH, Zhang XN, Mao W, Chen HP, Xu LR, Chen H, He XL, Le YP. A novel mutation of keratin 9 in a large Chinese family with epidermolytic palmoplantar keratoderma. *Br J Dermatol.* 150(4):647-651 (2004).
36. Szalai S, Szalai C, Becker K, Török E. Keratin 9 mutations in the coil 1A region in epidermolytic palmoplantar keratoderma. *Pediatr Dermatol.* 16(6):430-435 (1999).
37. Terrinoni A, Cocuroccia B, Gubinelli E, Zambruno G, Candi E, Melino G, Girolomoni G. Identification of the keratin K9 R162W mutation in patients of Italian origin with epidermolytic palmoplantar keratoderma. *Eur J Dermatol.* 14(6):375-378 (2004).
38. Li M, Yang LJ, Hua HK, Zhu XH, Dai XY. Keratin-9 gene mutation in epidermolytic palmoplantar keratoderma combined with knuckle pads in a large Chinese family. *Clin Exp Dermatol.* 34(1):26-28 (2009).
39. Bergman, R. Dermatopathology and molecular genetics. *J Am Acad Dermatol.* 58:3, 452-457 (2008).
40. Fritsch P, Hönigsmann H, Jaschke E. Epidermolytic hereditary palmoplantar keratoderma. Report of a family and treatment with an oral aromatic retinoid. *Br J Dermatol.* 99(5):561-568 (1978).

41. Bonifas JM, Matsumura K, Chen MA, Berth-Jones J, Hutchison PE, Zloczower M, Fritsch PO, Epstein EH Jr. Mutations of keratin 9 in two families with palmoplantar epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol.* 103(4):474-477 (1994).
42. Caputo, R. Atlas of Genodermatoses. Ed. Taylor and Francis. España.. Pp 69-91 (2006).
43. Terron-Kwiatkowski A, van Steensel MA, van Geel M, Lane EB, McLean WH, Steijlen PM. Mutation S233L in the 1B domain of keratin 1 causes epidermolytic palmoplantar keratoderma with "tonotubular" keratin. *J Invest Dermatol.* 126(3):607-613 (2006).
44. Bergman R, Khamaysi Z, Sprecher E. A unique pattern of dyskeratosis characterizes epidermolytic hyperkeratosis and epidermolytic palmoplantar keratoderma. *Am J Dermatopathol.* 30(2):101-105 (2008).
45. Rothnagel, JA, Lin, MT, Longley, MA, Holder, RA, Hazen, PG, Levy, ML, Roop, DR. Prenatal diagnosis for keratin mutations to exclude transmission of epidermolytic hyperkeratosis. *Prenat Diagn.* 18(8):826-30 (1998).
46. Thost A. Ueber erbliche Ichthyosis palmaris et plantaris cornea. Dissertation: Heidelberg (1880).
47. Unna PG. Ueber das Keratoma palmare et plantare hereditarium. *Arch Derm Syph.* 15:231-270 (1883).
48. Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Goto M, Nomura Y, Ando S, Abe M, Sawamura D, Shimizu H. Keratin 1 gene mutation detected in epidermal nevus with epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol.* 127(6):1371-4 (2007).
49. Codispoti A, Colombo E, Zocchi L, Serra V, Pertusi G, Leigheb G, Tiberio R, Bornacina G, Zuccoli R, Ramponi A, Campione E, Melino G, Terrinoni A. Knuckle pads, in an epidermal palmoplantar keratoderma patient with keratin 9 R163W transgrediens expression. *Europ J Derm* 19:114-118 (2009).
50. Torchard D, Blanchet-Bardon C, Serova O, Langbein L, Narod S, Janin N, Goguel AF, Bernheim A, Franke WW, Lenoir GM, Feunteun. Epidermolytic palmoplantar keratoderma cosegregates with a keratin 9 mutation in a pedigree with breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 6(1):106-110 (1994).
51. Radi O, Parma P, Imbeaud S, Nasca MR, Uccellatore F, Maraschio P, Tiepolo L, Micali G, Camerino G. XX sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am J Med Genet A.* 138A(3):241-246 (2005).

52. Sevier KB, Hatamochi A, Stewart IA, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, Maw MA. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet.* 75(2):179-185 (1998).
53. Kempter B, Grossbadern K. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *Trends Genet.* 8:226 (1992).
54. Cserhalmi-Friedman PB, Squeo R, Gordon D, Garzon M, Schneiderman P, Grossman ME, Christiano AM. Epidermolytic hyperkeratosis in a Hispanic family resulting from a mutation in the keratin 1 gene. *Clin Exp Dermatol.* 25(3):241-243 (2000).