



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE RUPTURA/UNIÓN DE LA
DELECIÓN DEL GEN STS EN LA ILX”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EN C. SERGIO ALBERTO CUEVAS
COVARRUBIAS**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013.



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE RUPTURA/UNIÓN DE LA
DELECIÓN DEL GEN STS EN LA ILX”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EN C. SERGIO ALBERTO CUEVAS
COVARRUBIAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE RUPTURA/UNIÓN DE LA
DELECIÓN DEL GEN STS EN LA ILX”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EN C. SERGIO ALBERTO CUEVAS
COVARRUBIAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina , en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GONZÁLEZ HUERTA LUZ MARÍA** con número de cuenta 93657091 con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE RUPTURA/UNIÓN DE LA DELECCIÓN DEL GEN STS EN LA ILX"**, realizada bajo la dirección del DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Vocal: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Secretario: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA
Suplente: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de julio de 2013

Midel Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por mi formación académica

A mi tutor principal: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias, por brindarme la oportunidad de trabajar en sus proyectos impulsando mi desarrollo académico, profesional y por creer en mí trabajo.

A mi comité tutorial: Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta y Dra. Martha Legorreta Herrera, por todas sus aportaciones a esta tesis

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

✚ A DIOS POR LA VIDA.

✚ A MI MADRE MA. DE LA LUZ HUERTA POR ENSEÑARME QUE CON PACIENCIA Y AMOR SE PUEDEN LOGRAR MIL COSAS. GRACIAS POR GUIARME Y ESTAR SIEMPRE CONMIGO

✚ A MI PADRE MARINO GONZÁLEZ POR INCULCARME EL RESPETO Y LA RESPONSABILIDAD EN EL TRABAJO Y TODAS LAS ACTIVIDADES COTIDIANAS. GRACIAS POR FORJARME UN CARÁCTER FUERTE.

✚ A MIS HERMANAS NORMA CELIA Y MARICELA QUE HAN SIDO SIEMPRE UN EJEMPLO, GRACIAS POR SU APOYO.

✚ A MI ESPOSO JAIME TORAL POR TODA LA PACIENCIA, TOLERANCIA, APOYO QUE ME HA BRINDADO DURANTE LA REALIZACION DE ESTE POSGRADO, PERO SOBRE TODO POR ENSEÑARME QUE TODO ES MAS FÁCIL CON AMOR Y RESPETO.

✚ A MIS HIJAS LUZ CECILIA, ANGELA GUADALUPE Y MAGDANI TIPASNE, POR DARME FUERZA AL VER SUS LINDAS SONRISAS EN CADA UNA DE SUS CARITAS, POR RECORDARME QUE LA INOCENCIA Y TERNURA DE UNA PEQUEÑA ES LO MAS VALIOSO QUE HAY PARA MI Y ME HACE PENSAR QUE PUEDE HABER ESPERANZA AUN EN TIEMPOS DIFICILES

✚ A MIS TRES GRANDES AMIGAS QUE SIEMPRE HAN COMPARTIDO TODAS MIS LOCURAS, GRACIAS MARY, LYDIA Y LUZ MA

**✚ A MIS FAMILIARES QUE GRACIAS A SUS CONSEJOS Y COMENTARIOS ME
HAN SERVIDO PARA IMPULSARME A SEGUIR SIEMPRE ADELANTE**

**✚ A LOS ESTUDIANTES Y COMPAÑEROS QUE PARTICIPARON DE ALGUNA
MANERA EN ESTE PROYECTO**

**✚ A LOS PACIENTES QUE PARTICIPARON EN ESTE PROYECTO QUE AUNQUE
PARA ALGUNAS PERSONAS ES UNA ENFERMEDAD NO TAN IMPORTANTE,
PARA ELLOS SIGNIFICA TODO LO CONTRARIO**

DEDICATORIA

A: ANGEL GONZALEZ HUERTA, †

A DONDE QUIERA QUE SE ENCUENTRE SE QUE SIEMPRE ME CUIDA Y PROTEGE, “UNA PERSONA DEJA DE EXISTIR, CUANDO ES OLVIDADA” Y TU SIEMPRE ESTARAS EN MI CORAZON Y MIS PENSAMIENTOS.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS _____	1
RESUMEN _____	2
ABSTRACT _____	4
INTRODUCCIÓN _____	5
OBJETIVOS _____	6
ANTECEDENTES _____	7
I. ICTIOSIIS LIGADA AL CROMOSOMAX _____	7
II. SULFATASA DE ESTEROIDES (SE) _____	9
III. GEN DE LA SULFATASA DE ESTEROIDES (<i>STS</i>) _____	12
IV. SECUENCIAS CRI-S232, G13 Y GENES VCX _____	14
V. <i>GEN HDHD 1</i> _____	18
VI. <i>GEN NLGN4</i> _____	20
VII. <i>GEN PNL4</i> _____	21
VIII. RECOMBINACIÓN Y DESLIZAMIENTO DE LA POLIMERASA _____	22
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA _____	25
HIPOTESIS _____	26
MATERIALES Y REACTIVOS _____	27
DISEÑO EXPERIMENTAL _____	28
I. DETERMINACION ENZIMATICA _____	30
II. EXTRACCION DE ADN _____	32
III. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA _____	33
IV. SECUENCIACIÓN _____	34
V. HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA _____	36
RESULTADOS _____	37

DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	50
ANEXO	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- PACIENTE CON ILX.

FIGURA 2.- CARACTERISTICAS DE LAS ICTIOSIS

FIGURA 3.- CARACTERISTICAS DE LAS ARILSULFATASAS

FIGURA 4.- REPRESENTACIÓN ESQUEMATICA GEN STS

FIGURA 5.- REPRESENTACIÓN GRÁFICA Y UBICACIÓN DEL GEN STS Y REGIONES FLANQUEADORAS

FIGURA 6.- ESQUEMA DE LA LOCALIZACIÓN DE RU1 Y RU2

FIGURA 7.- ESQUEMA DE LA UBICACIÓN DE LOS GENES VCX

FIGURA 8.- ESQUEMA DE LA LOCALIZACIÓN DE HDHD1

FIGURA 9.- ESQUEMA DE LA LOCALIZACIÓN DE NLGN4X

FIGURA 10.- ESQUEMA DE LA LOCALIZACIÓN DE PNLPA4

FIGURA 11.- ESQUEMA DEL DESLIZAMIENTO QUE PROVOCA DELECCIONES

FIGURA 12.- SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS

FIGURA 13.- SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS

FIGURA 14.- PACIENTE CON ILX

FIGURA 15.- FISH DE UN PACIENTE Y UNA PORTADORA DE ILX

FIGURA 16.- GEL DE AGAROSA CON DELECCIÓN DEL GEN STS

FIGURA 17.- ESQUEMA DE LA UBICACIÓN DE LAS REGIONES FLANQUEADORAS

FIGURAS 18 Y 19.- GEL DE AGAROSA DE LAS REGIONES FLANQUEADORAS

FIGURAS 20 Y 21.- RESULTADOS DE PACIENTES

FIGURAS 22-25.- GELES DE AGAROSA DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS

RESUMEN

Antecedentes La ictiosis recesiva ligada al X (ILX) es un error innato del metabolismo debido a la deficiencia de la enzima sulfatasa de esteroides (STS). La mayoría de los pacientes con ILX presentan delección completa del gen *STS* así como de sus secuencias flanqueadoras. Al parecer, la ubicación de repeticiones de número bajo de copias en ambos extremos del gen *STS* tiene un papel muy importante en la alta frecuencia de estas delecciones. Algunos pacientes con ILX, ya sea por delecciones terminales o intersticiales en la región cromosómica Xp22.3 implicando la región DXS1139 y al gen *STS*, muestran además la presencia de retraso mental (RM). El gen *VCXA* es el único gen localizado en esta región crítica. El objetivo del presente estudio es determinar el punto de ruptura analizando desde regiones flanqueadoras:(DXS89, DXS996, DXS1139, DXS1130, DXS1131, DXS1133, DXS237, DXS1132, DXF22S1, DXS1134, DXS7470) y genes adyacentes *VCX-A*, *VCX-C*, *PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1*). **Material y Métodos** Para el diagnóstico inicial de los 125 pacientes con ILX se determinó la actividad de la STS en leucocitos utilizando el sulfato de 7-³H]-dehidroepiandrosterona como sustrato. Así mismo se les realizó FISH (hibridación in situ con fluorescencia) para demostrar el número de copias del gen en células somáticas,. Para determinar el tamaño de la delección se amplificaron las regiones teloméricas DXS996 a centroméricas DXS278 incluyendo ambos extremos del gen *STS* así como los genes *VCXA* y *VCX-C* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Para tratar de entender otro posible mecanismo de delección y si este puede afectar más severamente en el fenotipo del paciente ya que puede involucrar marcadores génicos o bien genes contiguos **Resultados** Ningún paciente tuvo actividad de la *STS* (0.00 pmoles/mg proteína/hr). El FISH demostró únicamente el control interno utilizado correspondiente al la región centromérica de X y ausencia del gen *STS*. Se observaron varios patrones de delección, sin embargo englobándolos se establecieron en 2 grupos de los cuales uno corresponde a la delección por recombinación homóloga desigual la cual involucra solo marcadores genéticos adyacentes al gen, alrededor del 91.2%. El resto es la muestra que nos interesó ya que está involucrando aparentemente genes implicados en la con el Retraso mental, hiperactividad y datos clínicos de criptorquidia, que corresponden a la familia de los genes *VCX A/C*, *PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1* en 125 pacientes mexicanos con ILX.

Conclusión: Con los resultados obtenidos se propone como mecanismo de delección el deslizamiento de la polimerasa ya que en genes codificantes ya sea intrón-exón donde se llevo a cabo la delección no contienen secuencias CRI-S232, pero cabe destacar la importancia de los genes (*PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1*) involucrados ya que recientemente se han asociado con anomalías mentales que van desde déficit de atención hasta retraso mental.

ABSTRACT

Background X-linked recessive ichthyosis (ILX) is an inborn error of metabolism due to deficiency of the enzyme steroid sulfatase (STS). Most patients exhibit complete deletion ILX STS gene and its flanking sequences. Apparently, the location of repetitions of low copy number in both ends of the STS gene has a role in the high frequency of these deletions. Some patients with ILX, either terminal or interstitial deletions in chromosome region Xp22.3 region involving DXS1139 and STS gene, also show the presence of mental retardation (MR). The VCXA gene is the only gene located in this critical region. The aim of this study is to determine the breakpoint flanking regions analyzed from: (DXS89, DXS996, DXS1139, DXS1130, DXS1131, DXS1133, DXS237, DXS1132, DXF22S1, DXS1134, DXS7470) and adjacent genes *VCX-A*, *VCX-C*, *PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1*.

Material and Methods For the initial diagnosis of the 125 patients were determined ILX STS activity in leukocytes using sulfate 7 - [³H] dehydroepiandrosterone as substrate. Likewise underwent FISH (fluorescence in situ hybridization) to demonstrate the number of copies of the gene into somatic cells. To determine the size of the deletion regions were amplified telomeric to centromeric DXS278 DXS996 including both ends of the gene as well as genes STS VCXA and VCX-C by the chain reaction of polymerase. To try to understand another possible mechanism deletion and if it can more severely affect the phenotype of the patient and can involve genes or gene markers contiguous

Results No patient had STS activity (0.00 pmol / mg protein / hr). The FISH showed only used internal control relevant to the centromeric region of X and absence of the STS gene. Observed various deletion patterns, however engulfing settled into 2 groups, one of which corresponds to the deletion by homologous recombination which involves only unequal genetic markers adjacent to the gene, about 91.2%. The rest is the sign that we were interested in getting involved apparently because genes involved in the mental retardation, hyperactivity and clinical data of cryptorchidism, corresponding to the family of the VCX genes A / C, *PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1* in 125 patients ILX Mexican.

Conclusion With the results proposed mechanism deletion polymerase slippage since in genes encoding either intron-exon which conducted the deletion does not contain sequences CRI-S232, but note the importance of genes (*PNPL4*, *NLGN4*, *HDHD1*) involved and have recently been associated with mental abnormalities ranging from attention deficit disorder to mental retardation

INTRODUCCIÓN

La región distal del brazo corto del cromosoma X tiene la especial característica de presentar una frecuencia alta de deleciones intersticiales⁽¹⁾. Estudios previos han permitido asignar la ubicación de distintos genes en esta región; entre ellos se encuentran el gen de la sulfatasa de esteroides (STS), cuya deficiencia causa la ictiosis recesiva ligada al X (ILX) y distintos loci asociados con retardo mental (RM). Por otro lado, se han descrito deleciones intersticiales o terminales de la región 22.3 en el brazo corto del cromosoma X, en pacientes afectados con la asociación de varias enfermedades, llamada síndrome de genes contiguos o aneusomía segmental, condrodisplasia punctata recesiva ligada al X (*ARSE*), síndrome de Kallmann (*KAL1*) albinismo ocular tipo 1 (*GPR143*) y corta estatura (*SHOX*). El gen *STS* codifica para la enzima sulfatasa de esteroides (STS), la cual presenta una distribución ubicua y tiene la función de catalizar la hidrólisis de los sulfatos de esteroides ^(2,3). La ILX tiene una ocurrencia de 1:2000-6000 hombres y se caracteriza por presentar escamas adherentes, poligonales y oscuras en la piel ⁽⁴⁾. La mayoría de los pacientes con ILX (>90%) presentan grandes deleciones del gen *STS* así como de sus regiones flanqueadoras. Unos pocos pacientes con deleciones terminales o intersticiales de Xp22.3. Con base a estudios previos que reportan un alto porcentaje de la deleción es debida a la recombinación homóloga desigual en el presente trabajo se decidió identificar los puntos de ruptura en los pacientes que dicho mecanismo no estaba involucrado, así mismo sustentados en que el gen ligado al X de carga variable-A (*VCX-A*) como el único gene localizado en esta región crítica tiene una relación con retraso mental quisimos indagar que otros genes en el cluster Xp22.3 están involucrados en nuestros pacientes para tratar de entender más a fondo hasta donde está la ruptura y relacionarla fenotípicamente⁽⁵⁾.

Estudios en distintas áreas geográficas indican que prácticamente no hay diferencias raciales en el patrón de deleción que muestran los pacientes con ILX y pérdida del gen *STS* (8-12). Por otro lado, estudios previos señalan que el gen *VCXA* tiene un papel importante en la génesis de RM en algunos pacientes con ILX.

OBJETIVOS

GENERAL

- Identificación de la ruptura del gen *STS* y regiones adyacentes que contienen secuencias CRI-S232, para determinar si está involucrada la recombinación no homologa desigual en pacientes con Ictiosis ligada al cromosoma X.

PARTICULARES

- Identificación de el punto de ruptura/ unión que causa la deleción del gen *STS*
- Identificación de genes involucrados el la ruptura adyacente al gen *STS* que puede afectar aun más el fenotipo (*HDHD1, NLGN4, PNPLA*)

ANTECEDENTES

I.- ICTIOSIS LIGADA AL CROMOSOMA X (ILX)

El término ictiosis se ha 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 se origina 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 reclasificada por Touraine en 1958 y Greither en 1964, así como por Wells y Kerr en 1965, estudiando las manifestaciones clínicas y genealógicas, pudieron distinguir a la ictiosis ligada al cromosoma X (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 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. Predominan en cara anterior de abdomen, cuello, zonas de flexión y ambas extremidades. Respetan generalmente palmas de las manos y plantas de los pies (Figura 1) ⁽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 (Figura 2). Las más frecuentes son la IV y la ILX. Existen además otras condiciones ictiosiformes genéticamente indefinidas ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.



Figura 1. Paciente con ILX, manifestando escamas en las extremidades superiores del cuerpo.

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	1:300,000 rnv	Gruesas, verrugosas y oscuras.	Desconocido
Eritrodermia ictiosiforme congénita	AR	1:300,000 rnv	Finas.	Desconocido.

Figura 2. Características 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). rnv* = recién nacidos vivos

II.- 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⁾.

Las sulfatasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar las uniones éster- sulfato de varios esteroides sulfatados, a esta actividad se le conoce como “aril-sulfatasas” ⁽¹⁴⁾.

Se han descrito 6 arilsulfatasas: ARSA, ARSB, ARSD, ARSE y ARSF. Las codifican genes diferentes, tienen pH óptimos distintos y poseen diferentes susceptibilidades a inhibidores (cuadro II). La sulfatasa de esteroides (SE), es una enzima de distribución ubicua que hidroliza las uniones éster-sulfato de los sulfatos de esteroides ⁽¹³⁾. La SE se encuentra unida a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), cisterna de Golgi, retículo trans-Golgi y membrana plasmática. La SE se expresa en tejidos como placenta humana ^(13,15-17), fibroblastos, glándula mamaria y tubos uterinos ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Su pH óptimo oscila de 6.5 a 7.5, siendo su Km de 0.8 μM para el sulfato de estrona (ES), de 1.7 μM para el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) y de 0.6 μM para el sulfato de testosterona (TS) ⁽¹⁸⁻²¹⁾. La deficiencia de SE condiciona ILX debido a la acumulación de sulfato de colesterol en el suero, la membrana de los eritrocitos, el estrato 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 ⁽¹³⁻¹⁹⁾.

La SE está compuesta de 583 aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la enzima madura de 561 aminoácidos. Este proceso dura aproximadamente 2 días, la vida media de la enzima es 4 días. La enzima activa está formada por múltiples subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 63 kDa, el agregado activo más pequeño es un dímero de 126 kDa ^(18, 22,23). Los extremos N- y C- se localizan en la porción luminal de la membrana RER ⁽²⁴⁾.

La enzima activa o funcional está formada por dos dominios, como fue determinado por cristalografía de rayos X ⁽²⁰⁾,

Evidencias químicas y genéticas parecen indicar que la aril sulfatasa o SE comprende dos isoenzimas la "s" y la "f" (s de slow y f de fast) que se caracterizan por una movilidad electroforética diferente, se codifican por genes distintos, en cuyo caso únicamente la forma s corresponde a la SE. ⁽²³⁾. Estas isoformas ("s" y "f") ligadas al cromosoma X son producto de genes diferentes y no son consecuencia de modificaciones post-traduccionales del mismo producto genético. La expresión de las dos variantes es tejido específico: la forma "s" es más abundante en placenta, tiroides, corazón, bazo, musculo esquelético y glándula suprarrenal, mientras que la forma "f" se detecta en hígado, riñón y páncreas. Aunque ambas comparten algunas características bioquímicas, difieren en su estructura proteínica, pH óptimo, labilidad al calor, propiedades antigénicas y especificidad a sustratos. La forma "s" muestra actividad específica hacia los sustratos naturales de la SE y la forma "f" tiene solamente de 2-7 % de actividad de la SE (Figura 3) ^(25-27.)

ENZIMA	SUBSTRATO	pH OPTIMO	INHIBIDOR	ENFERMEDAD	REF.
ARSA	Sulfátidos	Ácido	Fosfato	Leucodistrofia metacromática	27
ARSB	Sulfatos de dermatán	Ácido	Bario	Mucopolisacaridosis tipoV	28
ARSC	Esteroides Sulfatados	Neutro o alcalino	CN-	Ictiosis ligada al cromosoma X	29
ARSD	*	*	*	*	30
ARSE	*	Alcalino	Warfarina	Condrodistrofia puntacta	30
ARSE	*	*	*	*	30

Figura 3. Características de las arilsulfatasas. * se desconoce.

III.- GEN DE LA SULFATASA DE ESTEROIDES (*STS*)

El gen *STS* codifica a la SE y se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.3) en una región de 146 Kb muy cerca de la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones de tamaño variable y dos regiones que no se transcriben, una en el extremo 5' de por lo menos 206 pb y otra más en el extremo 3' de 668 pb (Figura 4). Tiene una señal de poliadenilación (AATAAA) de 13 pb antes del comienzo de la cola de poli-A ⁽²⁸⁾. La región promotora del gen *STS* presenta un bajo contenido de secuencias CpG. En el extremo 5' del gen *STS*, se han identificado varios sitios de inicio de transcripción dentro de una región de 1.3 Kb. ⁽²⁹⁾.

Por otra parte, se han identificado 3 transcritos primarios en distintas líneas celulares, cada uno con pesos moleculares diferentes (2.7, 5.2, y 7.2 Kb), cuya función se desconoce. ^(28,29)

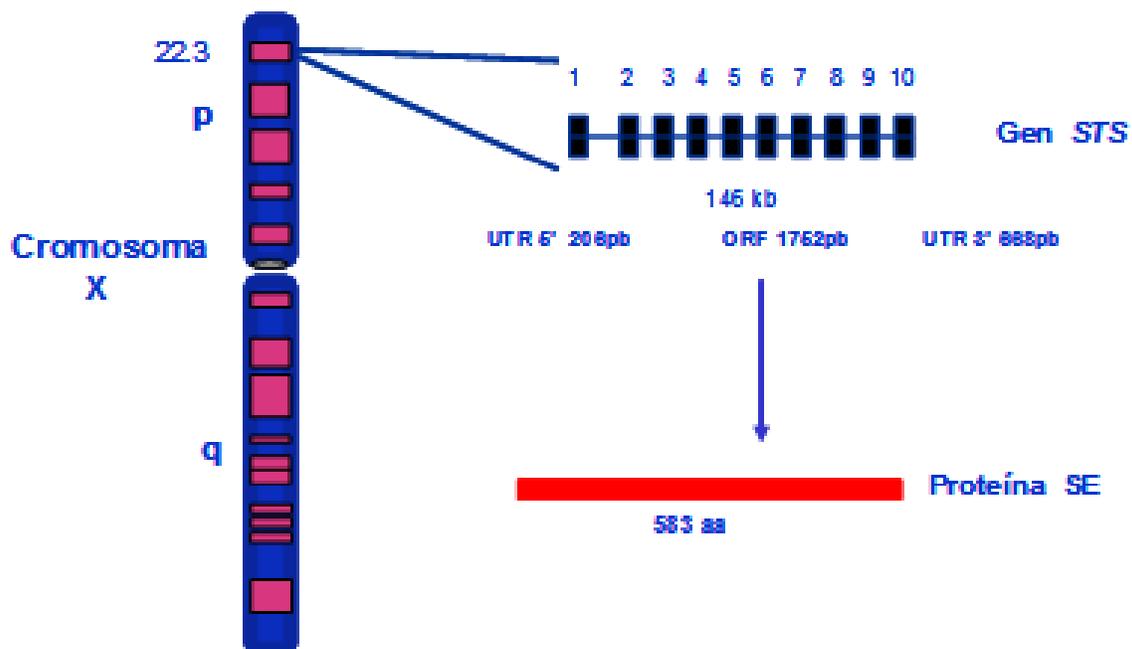


Figura 4: Esquema que representa la ubicación del gen STS, los exones e intrones, el OFR y la proteína (SE).

La mayoría de los pacientes con ILX (85-90%) presentan pérdida total del gen STS. Esta alta incidencia de deleciones se puede deber a un intercambio aberrante X-Y durante la división mitótica en espermatogonias u ovogonias y el mecanismo se debe al mal apareamiento de los locus hipervariables repetidos (llamados CRI-232) en la meiosis femenina o masculina, lo que conduce a recombinación discordante y deleción del gen (30,31,32-45).

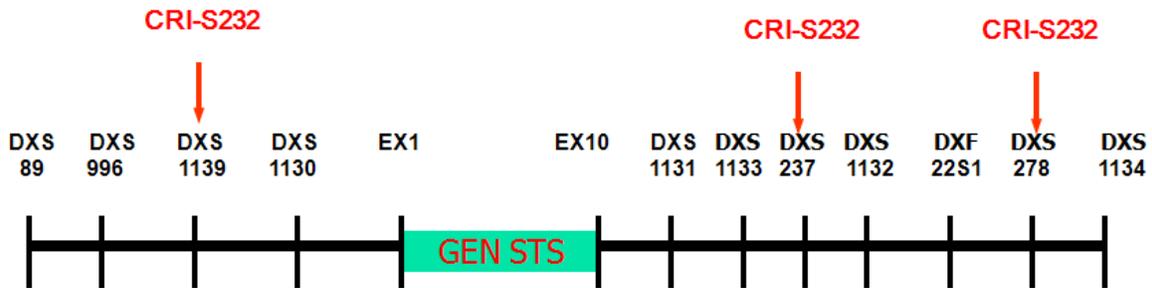
Se han descrito once mutaciones puntuales críticas para el gen STS, nueve generando sustituciones de aminoácidos y dos a codón de stop, éstas son: p.Ser341Leu, p.Gli344X, p.Trp372Arg, p.Trp372Pro, p.Trp372Ser, p.Gly380Arg, p.Gln389Term, p.His444Arg,

p.Cis446Tir, p.Arg454His, p.Arg454Cis, p.Gln560Pro. Cada una de estas mutaciones resultó en pérdida completa de la actividad enzimática y de ahí la incapacidad del cuerpo para sintetizar hormonas esteroides activas desde sus sulfatos conjugados. (46-54)

IV. SECUENCIAS CRI-S232 Y G1.3 Y FAMILIA DE LOS GENES VCX

Estudios sobre deleciones intersticiales en el brazo corto del cromosoma X, especialmente del gen STS, sugirieron 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 (X:7,137,497 a 7,272,851 pb) abarcando una distancia de 1,237,497 pb distante desde el extremo 5' con DXS1139 que contiene secuencias CRI-S232 y hacia 3' con DXS278 una distancia de 879,475 pb como se esquematiza en la Figura 5 (A y B). Se ha postulado que la presencia de estas secuencias condiciona 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 (32,33). En un estudio realizado en 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 DXS119 y DXS278, ambas rupturas se han descrito en caucásicos, japoneses e israelitas (55,56) en este estudio se postuló que estas rupturas se llevaron a cabo por recombinación homóloga desigual debido a las secuencias CRIS-232 y G1.3 que se encuentran intercaladas entre estas regiones como se esquematiza en la Figura 5 A y B(57-61).

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⁽³⁹⁾



A)

B)

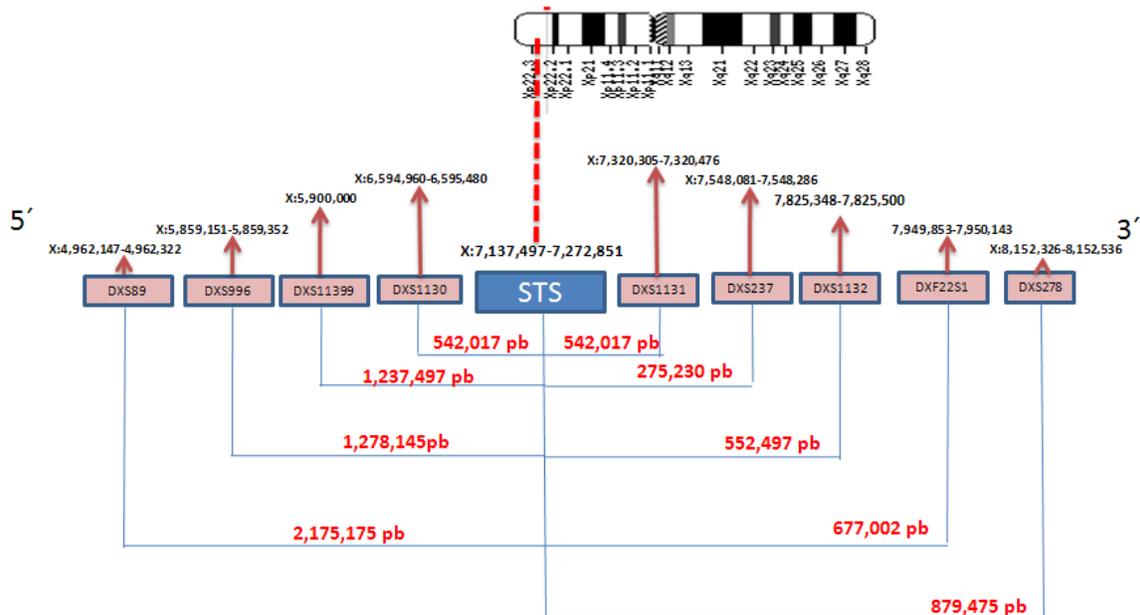


Figura 5: (A): Representación gráfica del gen STS y regiones flanqueadoras. Las flechas indican la posición de secuencias CRI-S232 en DXS1139, DXS237 y en DXS278, DXF22S1 se encuentran presentes las secuencias G 1.3, (B) representación esquemática de las posiciones en Xp22.3 de las diferentes marcadores DXS. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Las secuencias CRI-S232 presentan una secuencia de 7Kb y se organiza en 4 regiones designadas como a, b, c y d, como se muestra en la Figura 6. Las secuencias b y c revelan que éstas contienen VNTRs (repeticiones en tándem en número variable) designados como elementos RU2 y RU1 respectivamente con altos contenidos de GC e hipervariables en loci Xp22.3del cromosoma X y con menos variabilidad en los loci del cromosoma Y por debajo de la región pseudoautosómica. Las secuencias de las regiones “a” demostrarán secuencias estables. El elemento RU1 tiene 30 pb repetidas en el cromosoma X con un 60% de GC, además muestran una variación mínima entre los individuos. El elemento RU2 es hipervariable en el locus CRI-S232 del cromosoma X, presenta un intervalo que va de 0.6-23 kb entre individuos y contiene 65% de GC ⁽⁶²⁾

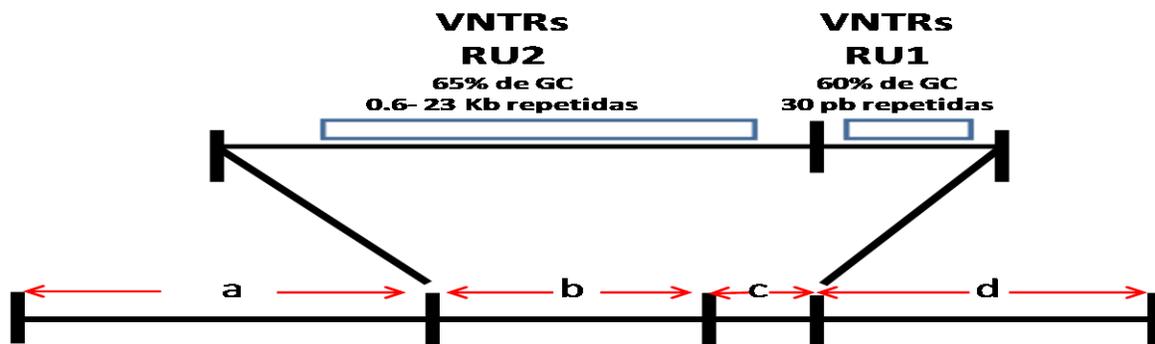


Figura 6: Esquema que representa la localización de las regiones RU1 y RU2

Estudios previos revelan al gen ligado al X de carga variable-A (VCX-A) como el único gen localizado en esta región crítica. VCXA es una proteína de unión a capucha no canónica que se une únicamente al RNAm capuchado VCXA puede regular la estabilidad del ARNm. ⁽⁶³⁾La familia de genes VCX/Y está compuesta de cuatro genes localizados en Xp22.3 (VCX-A, VCX-B1, VCX-B y VCX-C) y dos en Yp11.2 (VCY.D y VCY-E). Recientemente los nombres de estos genes ubicados en Xp22.3 cambiaron a VCX3A, VCX, VCX2, VCX3 respectivamente. La presencia del gen VCXA en pacientes con ILX e

inteligencia normal sugiere que es necesaria una copia intacta del gen VCXA para mantener una inteligencia normal. Sin embargo un estudio previo en dos hermanos con ILX y pérdida del gen VCXA, en la cual uno de ellos presentaba inteligencia normal parecía contradecir esta hipótesis. ⁽⁶³⁾

El patrón de deleción que muestran los pacientes de ILX y pérdida del gen STS. Por otro lado, estudios previos señalan que el gen VCXA tiene un papel importante en la génesis del RM (retraso mental) en algunos pacientes con ILX. ^(33,39,63-65)

Se han descrito 178 enfermedades que cursan con retraso mental ligado al cromosoma X, de las cuales 120 entidades son sindrómicas y 58 con retraso mental no específico. El retraso mental ligado al cromosoma X, no específico tiene una frecuencia del 0.15% en población masculina, y está causado por defectos en varios genes diferentes. Se ha sugerido un locus de 1.5 Mb localizado en la región Xp22.3, que incluye el gen VCX-A a una distancia de 674,338 pb, como se muestra en la Figura 7⁽⁶⁶⁾, también denominado VCX3A y VCX. Sin embargo, el gen que causa el RM en ILX aún no ha sido identificado. El locus del MR fue inicialmente mapeado a 3 Mb del intervalo genómico entre DXS1131 (4,11Mb) y STS (7.05 Mb). Estudios de mapeo de deleción en pacientes con o sin déficit cognitivo proponen que el gen VCX-A es un candidato para el RM en Xp22.31. Estos autores demuestran que el gen VCX-A fue retenido en pacientes con inteligencia normal; sin embargo, en pacientes con retraso mental se presentó una deleción grande comprometiendo también el gen neurologina 4 (NLGN4) (5.80 Mb), el cual se ha asociado recientemente con autismo y reducción del desarrollo cognitivo. ⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾

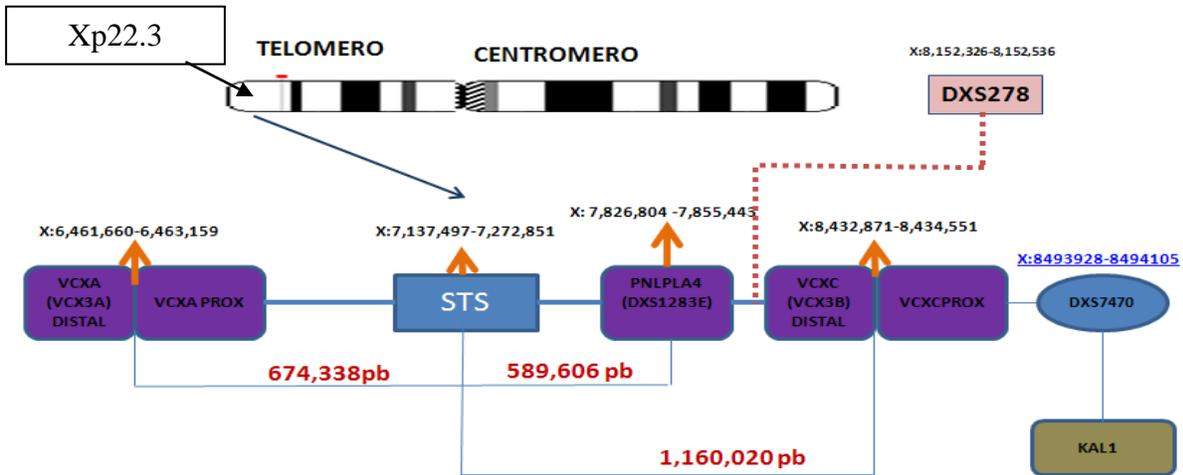


Figura 7: Representación esquemática de la ubicación de los genes de la familia VCX, tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

V. *HDHD1* (GS1, HDHD1A; FAM16AX; DXF68S1E)

El gen *HDHD1* está presente en el cromosoma X muy próximo al gen *STS*, el cual codifica para la enzima que está deficiente en la ILX, este desorden se origina principalmente por deleciones en el cromosoma X, abarcando ambos el gen *STS* y el gen *HDHD1* ⁽⁶⁹⁾.

La Pseudouridina es el quinto nucleósido más abundante en el RNA de este gen, no se metaboliza en mamíferos, pero se excreta intacto en orina. Se ha demostrado que los eritrocitos humanos contienen pseudouridina 5'fosfatasa. La actividad parcial de la enzima purificada depende del Mg^{+2} y se inhibe por Ca^{+2} y vanadio, sugiriendo que pertenece a las dehalogemas haloácidas de la familia de las fosfatasa, con una masa molecular baja de 26 kDa, lo que sugiere que esta fosfatasa puede ser el producto proteínico codificado por el gen *HDHD1* (desalogenasa haloácida que contiene un

dominio 1 hidrolasa “ haloacid dehalogenase-like hydrolase domain- containing 1), en la posición Xp22.3 en 6,966,961-7,066,231, como se muestra esquemáticamente en la Figura 8, como previamente se mencionó muy próximo al gen *STS* (70). El papel de *HDHD1* es probablemente la degradación de 5’PsiMP y también puede ser del derivado 2’-0-metil, el cual también está presente en el rRNA. Experimentos realizados por Preumont y cols(71). en sistemas celulares libres indican que el 5’-PsiMP se fosforila después a di y tri fosfato de pseudouridina. Esta conversión probablemente involucra cinasas de uridina/citidina, las cuales tienen una amplia especificidad a sustratos y nucleótidos de cinasas difosfatadas(71,72). Por lo que la presencia de una enzima que actúa en 5’-Psi<mp con una alta afinidad es presumiblemente un mecanismo eficiente para prevenir la incorporación aberrante de pseudouridina en el RNA o en el azúcar del nucleótido difosfatado. Sin embargo se desconoce el papel de muchas fosfatasas de la familia HAD. Estudios de Kuznetsova et al. en respecto a la actividad catalítica de una serie de fosfatasas de la familia HAD codificado por el genoma de *E. coli*, detectó que estas enzimas actuaban con una baja eficiencia de actividad catalítica en una serie de esteres fosfatados.(73)

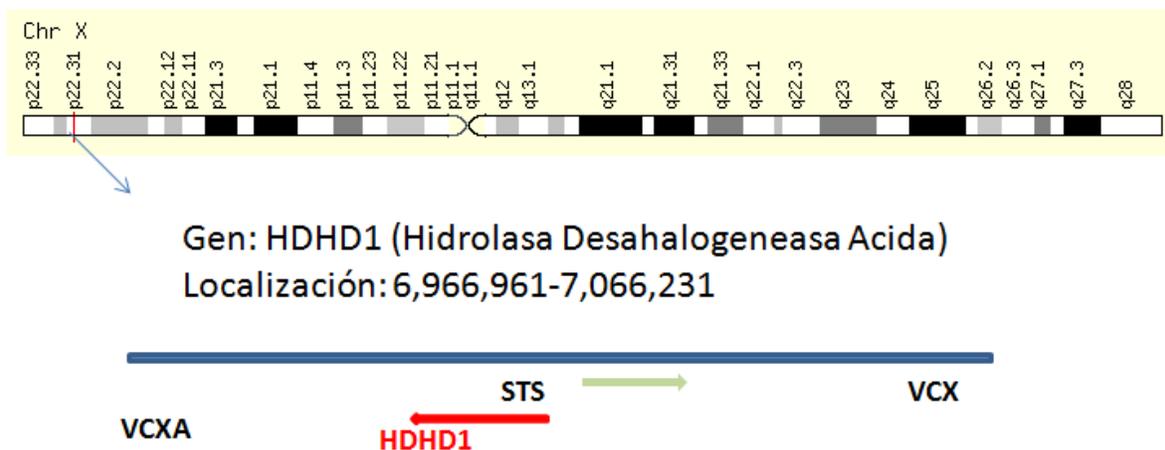


Figura 8: Representación esquemática de la localización del gen HDHD1, en Xp22.3, modificado de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

VI. NLGN4 (HLNX; HNLX; NLGN; HNL4X; NLGN4; ASPGX2; AUTSX2)

Neuroliginas son una familia de moléculas de adhesión que se expresan en las neuronas postsinápticas, interactúan con neurexinas que se expresan en neuronas presinápticas. Se cree que la interacción de la neuroligina - neurexin juega un papel en la cantidad, la especificidad, y la estabilización de la formación de la red sináptica. (74)

Se han identificado cuatro miembros de la familia neuroligina en ratones (*NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3* y *NLGN4*), mientras que cinco miembros de la familia neuroligina se han identificado en seres humanos: *NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3*, *NLGN4*, y *NLGN4Y*. *NLGN3* y *NLGN4*, éste último localizado en Xp22.31 en la posición 5,808,803-6,146,706 pb en el cromosoma X, como se esquematiza en la Figura 9. Se han reportado en ocho familias las mutaciones en este gen y el gen *NRXN1* que tienen miembros con discapacidad intelectual y / o trastornos generalizados del desarrollo que abarca el espectro del síndrome de Asperger con el autismo. (74) Además, las mutaciones en *NRXN1* se han detectado en cuatro pacientes con autismo. Varios estudios, sin embargo, no han podido detectar una alta tasa de mutaciones *NLGN* en pacientes autistas, lo que sugiere que las mutaciones *NLGN* pueden ser responsables sólo de un pequeño subconjunto de casos de autismo. (74-76)

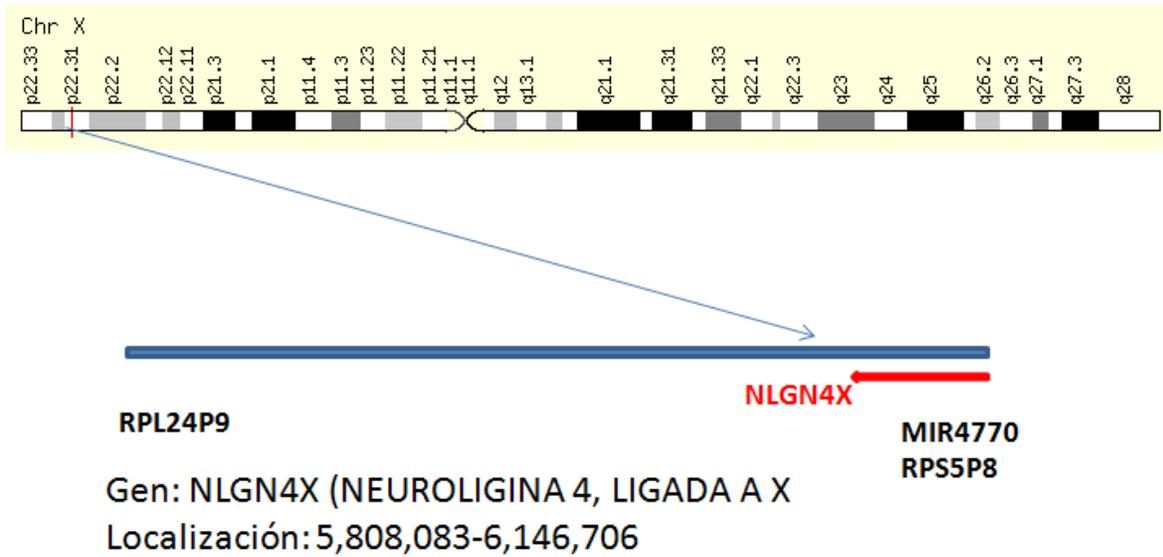


Figura 9: Localización del gen *NLGN4*, en Xp22.31, modificada de NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8226>

VII. *PNPL4* (GS2, DXS1283E)

Originalmente descrito como GS2, es una región que codifica para la enzima fosfolipasa A2, independiente del calcio (iPLA2n o PLA2-VIF), es una variedad enzimática implicada en el metabolismo lipoproteico, dada su actividad como tri-acil-glicerol-lipasa y acil-glicerol-transacilasa, y en la regulación de los niveles celulares de ácido transretinóico (retinol lipasa y transacilasa). Las fosfolipasas A2 (PLA2) constituyen un grupo de enzimas que difieren con respecto a secuencias, función, localización y requerimiento por cationes divalentes. Desempeñan un papel importante en diversos procesos celulares, incluyendo la digestión y el metabolismo de fosfolípidos. Las iPLA2 están involucradas, en particular, en el señalamiento intracelular, por lo que son importantes en la regulación del metabolismo lipídico, en la remodelación de los fosfolípidos de la membrana, en la

función peroxisomal y en la ruta de salvamento de calcio y apoptosis (77). El descubrimiento y la identificación de estas funciones con dominios patatina (*PNPLA*) revelan el papel fundamental de esta nueva familia de lipasas/transacilasas en el control de la homeostasis de los lípidos y la energía en los organismos superiores, el gen *PNPLA4* se encuentra localizado en el cromosoma X en Xp22.31, codifica un producto de 253 aa, se encuentra en la posición 7,866, 804 a 7,895,780 nucleotidos en el cromosoma X, como se muestra en la Figura 10(78-79).

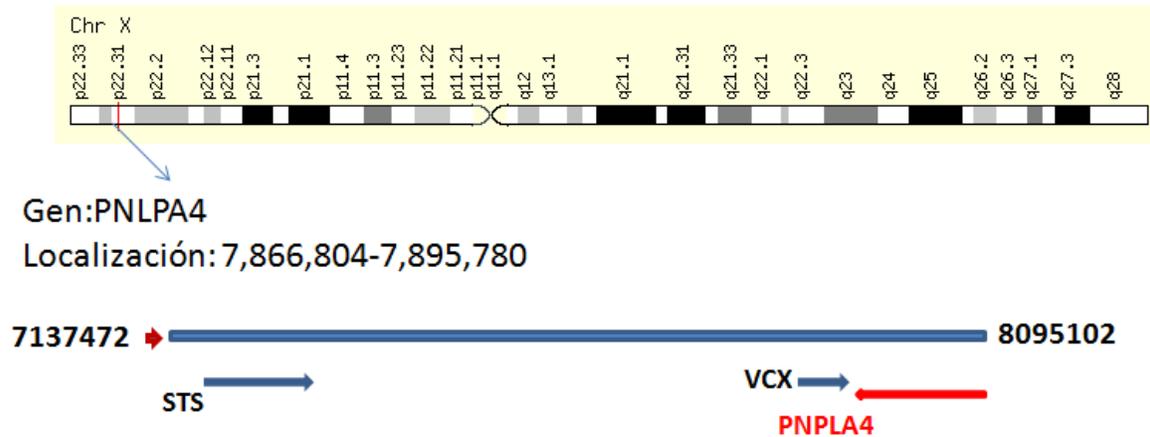


Figura 10: Localización del gen *PNPLA4*, en Xp22.3, modificado de NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

VIII. RECOMBINACION Y DESLIZAMIENTO DE LA POLIMERASA

Actualmente se conocen los mecanismos que originan elevada tasa de mutación espontánea característica de los microsatélites, así como los procesos celulares que generan inestabilidad en estas secuencias. Los principales mecanismos propuestos son el

deslizamiento de las polimerasas de ADN durante la replicación (o slippage) y la recombinación ⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾

- El deslizamiento de las polimerasas de ADN: Durante la replicación de secuencias cortas repetidas en tándem, cuando se produce la disociación-reasociación de las cadenas, se pueden formar pequeños bucles, como se muestra en la Figura 11. Estas estructuras, si no se reparan, darán lugar a un aumento o disminución del número de unidades repetidas, dependiendo de si el bucle se forma en la cadena de nueva síntesis o en la parental, respectivamente ⁽⁸²⁾.

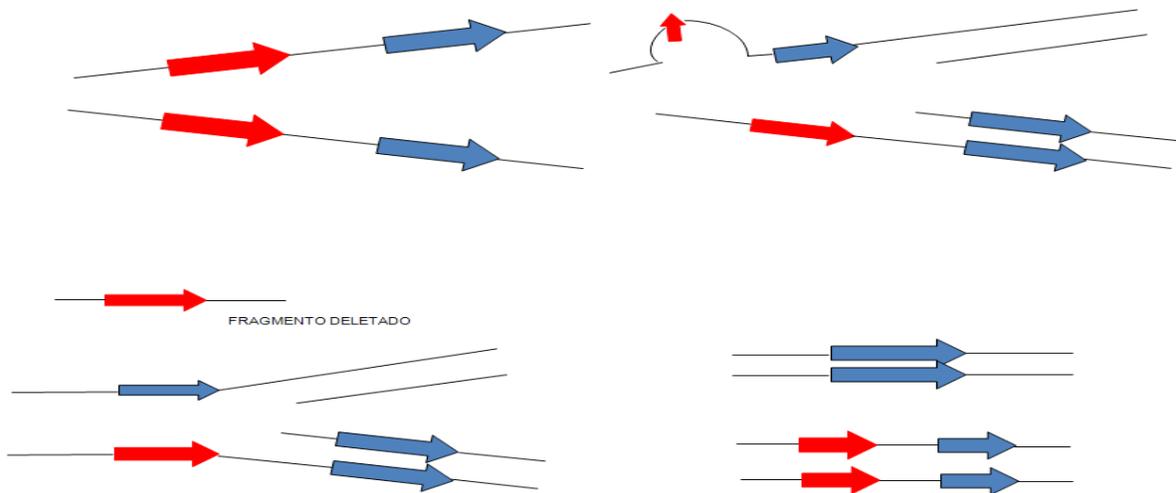


Figura 11: Representación esquemática del mecanismo de deslizamiento, que se puede llevarse a cabo en las deleciones

- **Recombinación.**

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 ADN (DSB). Más de 250 DSB son formadas por células meióticas, de los cuales sólo un grupo produce entrecruzamiento que conduce a la formación de quiasmas, muchos eventos de recombinación no producen entrecruzamientos. 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 se resuelven para originar 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 con este modelo, un extremo DSB invade un homólogo y ceba la síntesis de ADN, la cadena naciente se desplaza y se aparea con la secuencia complementaria sobre la segunda DSB para sellar su ruptura. (83-84)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La ILX tiene una frecuencia de 1-6 por cada 10,000 varones vivos, sin embargo en nuestro laboratorio del Hospital General de México, se han detectado un número de casos que supone una incidencia más alta, dado que en los últimos años nuestro banco de DNA es de alrededor de 125 pacientes, considerando que se trata de una Institución de concentración.

Hasta el momento se ha propuesto que el mecanismo de delección del gen *STS* que conduce al fenotipo de ILX se lleva a cabo por medio de la recombinación homóloga no alélica. La presencia de secuencias repetidas CRIS232 flanqueadoras del gen *STS*, pueden provocar mecanismos no homólogos; sin embargo, en nuestro laboratorio existe el indicio de que puede no ser el único mecanismo; ya que hemos encontrado puntos de ruptura heterogéneos en un número importante de pacientes. Con base en estos antecedentes proponemos identificar el punto de unión o sitio de ruptura que involucra dichas regiones en una muestra de pacientes mexicanos con ILX. A pesar de que es un padecimiento no severo, si es una causa de carga psicosocial y estética para los pacientes afectados que se ven retraídos en su desenvolvimiento personal, por lo que este estudio pretende conocer más a fondo el mecanismo molecular para que el paciente y sus familiares reciban un asesoramiento lo más completo posible.

HIPOTESIS

El principal mecanismo en la delección total del gen STS en pacientes con ILX, será el que involucra secuencias que contienen regiones CRI-S232, provocado por la recombinación no homologa desigual.

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES

La muestra incluyó 125 pacientes masculinos no relacionados genéticamente, referidos al Servicio de Genética del Hospital General de México, desde 1999 a 2010. Los pacientes y/o padres de los pacientes dieron su consentimiento para participar. Cabe mencionar que los pacientes inicialmente pasan al servicio de dermatología, donde son valorados e inmediatamente son referidos al servicio de genética, en donde se les realizó el diagnóstico clínico de ictiosis ligada al cromosoma X con base en los criterios clínicos. Éste análisis lo realizaron médicos especialistas en genética médica.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico de ILX
- Actividad enzimática de la SE nula
- Delección total del gen STS

Criterios de exclusión:

- Pacientes con mutaciones puntuales o deleciones parciales (muestras de ADN que amplificaban los exones del gen STS)
- Actividad de la SE

Criterios de eliminación

- Pacientes que no deseaban participar en el estudio
- Pacientes a los que no se les pudieran concluir los estudios moleculares

VARIABLES.

Independiente:

- Ictiosis ligada al cromosoma X

Dependiente:

- Puntos de ruptura/unión que provocan la delección del gen

DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Captación de pacientes que acudan al servicio de Genética o Dermatología del Hospital General de México con datos clínicos de Ictiosis
2. Punción Venosa (10 ml) anticoagulada con EDTA
3. Separación de 3 ml de sangre para extracción de ADN por el método salino, que se utilizó para amplificar los extremos 5' y 3' mediante PCR punto final del gen STS y determinar si el arreglo molecular era delección total del gen.
4. Los 7 ml restantes se utilizaron para aislar los glóbulos blancos y realizar el ensayo enzimático, el cual demostró si había o no actividad de la enzima Sulfatasa de esteroides (SE).
5. Con la actividad nula de la SE (0.0 pmol/mg de proteína/hora) y la ausencia del gen STS se confirmaba el diagnóstico de Ictiosis ligada al cromosoma X, por delección total del gen STS.
6. Identificación del estado de portadora de la madre o hermana del paciente, así como confirmación de la presencia de una sola copia del gen STS en los pacientes con ILX, mediante Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

7. Se procedió a delimitar la ruptura amplificando mediante PCR de punto final las regiones flanqueadoras que tenían secuencias CRI-S323 del extremo 5' se amplificó DXS1139 y del extremo 3' DXS237 y DXS278
8. Si la ruptura no era identificada en los marcadores del punto 7, se procedió a realizar PCR de punto final amplificando del extremo 5' los marcadores DXS1130,DXS1139,DXS996 y DXS89 y del extremo 3' los marcadores DXS1131, DXS1133, DXS1132,DXS22S1,y DXS1134.
9. Si aun no se identificaba la ruptura se procedió a realizar PCR punto final de la familia de los genes *VCX (A,B y C)*, *HDHD1*, *PNPLA*,*NLGN4* y *DXS7470*.

I.- DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SULFATASA DE ESTEROIDES

Para el diagnóstico de ILX se llevó a cabo el ensayo enzimático de la STS. A partir de una muestra de sangre periférica (10 mL) se obtuvo la fracción leucocitaria la cual se resuspendió en 500 μ l de amortiguador (Tris pH 7.4); con ayuda de un polytrón con vástago del número 10 se obtuvo un homogenizado, se libero a la enzima microsomal (arilsulfatasa C). Inmediatamente el homogenizado se colocó en contacto con el sustrato sulfato de 7- 3 H]-dehidroepiandrosterona (16.3 Ci per mmol, NEN, Boston, Mass.) (10 μ l de sustrato por cada 200 μ l de homogenizado equivalente a una concentración de 0.1 μ Ci/ml) se mezcló perfectamente y se incubó durante 1 hr a 37°C .

La reacción enzimática se detuvo con 1 mL de benceno frío, el cual al mezclarse formó 2 fases (acuosa /orgánica). Se extrajeron 600 μ l de la fase orgánica que contenía el sustrato hidrolizado y se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo y con ayuda de un contador de centelleo BECKMAN LS300 se cuantificó el sustrato hidrolizado. El ensayo se realizó por duplicado.

La actividad enzimática se calculo en pmol/ mg de proteína / h, tomando como referencia la curva de albumina como limite de 1 mg y considerando que 16,000 cpm equivalen a 1 pmol. Cabe mencionar que la captura de la emisión b por el liquido de centelleo en el equipo de LS6500 Beckman, es detectada mediante un fotocátodo y amplificado por un tubo fotomultiplicador y convertido en cuentas por minuto (c.p.m).

II.- EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

El material ADN se extrajo a partir de una muestra de sangre periférica, utilizando el método salino, que consiste en el empleo de NaCl a diferentes concentraciones adicionando agentes tensoactivos con la finalidad de obtener ruptura de membranas y extracción de miscelas/proteínas de las membranas celular y nuclear obteniendo el material nucleico con una calidad de 1.8 en relación a la absorbancia 260nm/ 280 nm.

A) Obtención de muestra

1.- Se extrajeron 10 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, de los cuales se aislaron los globulos blancos, mediante centrifugación, que se lavaron con solución de TTS (Tris-Tritón-Sacarosa) en una proporción 1:1:1. La ruptura membranal se inicio colocando 540 μ l de NaCl al paquete globular, con agitación por dos min. Enseguida se agregaron 30 μ l de SDS se agitó durante 5 min y por último se adicionaron 200 μ l de NaCl saturado agitando durante 10 min. La mezcla se centrifugó por 20 min a 11,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se decantó en un tubo estéril y se procedió a precipitar el ADN con 2 ml de etanol frio.

2.- La muestra de ADN se capturo con una varilla estéril y se lavó con Et-OH al 70%. Se eliminó el exceso de etanol y la muestra se resuspendió en 250 μ l de agua inyectable durante 2 h a 60 °C.

Las muestras de DNA de los pacientes obtenidas por el método salino se utilizaron para amplificar las regiones telómero-DXS996-DXS1139-DXS1130-5' STS-3' STS-DXS1131-DXS1133,DXS237-DXS1132-DXF22S1-DXS278 centrómero (tomados de la literatura Schaefer L, 1993) se describe la secuencia en la Figura 12. Así como la secuencia de oligonucleótidos correspondientes a la familia de los genes *VCX*, *PNLPA4*, *DXS7470*, *NLGN4* Y *HDHD1*, se describe la secuencia y el tamaño del producto de PCR en la figura

13, los cuales se diseñaron en el laboratorio utilizando el programa Primer 3, y utilizando el software de BLAST para discriminar homologías con la base de datos de los nucleótidos correspondientes al homo sapiens (NCBI describe a continuación su secuencia).

Locus	Primer	Tm (°C)	Product o de PCR (pb)
DXS996	F AAA TTC TTG CCT AGG CCA CTC TAG G R ACG TTG TTC TGG ATC GTA TGC TAG G	62	153-171
DXS1139	F GCT TGG ATC AGG GCT GGA ATT AG R TTA AAC AAG GGC CAT TCT GCA AG	60	500
DXS1130	F TGT CTC AAC CGT CAA GTCA C R CTT GTC TTT GAA GAT GCT CCC	60	367
5' GEN STS	F GGC CTA GAA GAA GGT TGA AGG TCC C R AAG AGG TTG GAT GAG ATG GGC ATA C	60	292
3' GEN STS	F GAA ATC CTC AAA GTC ATG CAG GAA G R CCT CCA GTT GAG TAG CTG TTG AGC T	60	363
DXS1131	F CCA AAC TGC CAC TGG TTG AG R CCG TGA TCT CTG ATG AAC CG	58	170
DXS1133	F TGG TAG AAT ACA CTG CAG GTG TGC R CAG CTT GTT AAG TGC TGT CTA TCC	60	260
DXS237	F CAT GTG AGG AAT ACA GGA GCG AA R GCC AAC TCA GCT AAT GAC TGT AG	55	400
DXS1132	F TGC TAC AAG CAT TTC AGA GG R CAA GCT CTG ACA TGT GAC TTC	55	152
DXF22S1	F ATC CAC TCC CCA TCT TAC CTT TCC C R CAA ATA GAC CCC TTC TTG TCT GGG	62	262
DXS278	F CCT TGA GTC TTT GTT CTG GAA CCC R CTA CGT GGT TGA ATG CCT GGA CTC	55	210
DXS1134	F TGA GTA TGT GCT TTG AGC TAG GGT C R CTG CGA ACA ATT CTT TTA GTT CCT C	50	400

Figura 12: Secuencia de oligonucleótidos correspondiente a las regiones flanqueadoras, Schaefer L. 1993

II.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PUNTO FINAL

A) Diseño de oligonucleótidos y PCR

El diseño de los oligonucleótidos se llevo a cabo con base a la secuencia descrita en la base de datos del genoma humano <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

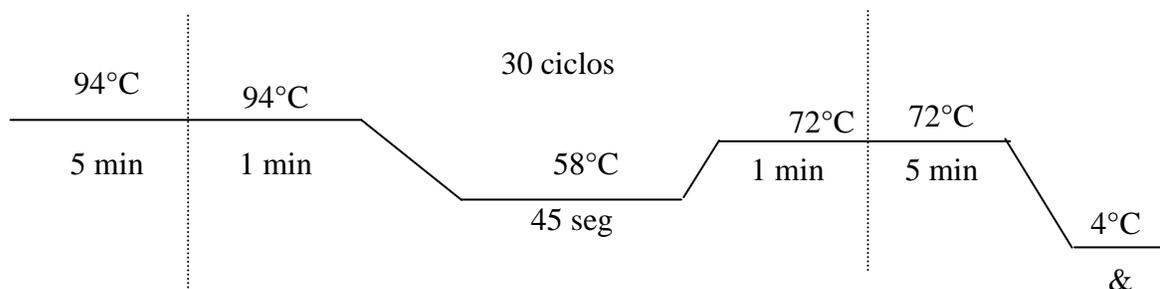
Locus	Primer	Tm (°C) Temperatura de fusión	(pb)
VCXA-dis	F CAA GAT GTG TCC AGA CAT TCC C R GCC TGG ATA CTC CCA AAA TTC TCA T	62	372
VCXA-prox	F AAG AAA AGA TCC TCC CAG TTC AC R CGG TCC TCT TCA TAT AGC AAA GT	60	313
VCXC-dis1	F TTA CCA TAT CCA CAG TAC GTA GTA R ACA GTA CTA CTT CTT ATG TCT CT	60	187
VCXC-prox1	F AGT ACA AGC CCA GAC TTC AGC AAT R CAT GGT GAC TTG ATA GTG CCC AG	60	213
<i>PNPL4A</i>	F AGA CGC GAA GAG GGT AAG GC R GAA AAG TAC CAT CCT CCC AC F AGC TTG GGG CTC AAA TCC AGA GAT ATT R TTA GAC TTT GGG GTA CTG CTG TTG GGA A	58	220-560
DXS7470	F CCC AAA GTA AGG ATT TTG CCA C R CAA AAA TTG GCA AAT AGG ATC TA	55	230
<i>NLGN4</i>	F1 CGTGGGCACGTAGATGTTTAAG R1 GCTGTGGATGTGGATGCAGATT F12 CAGGATACCAAGTTCATTACAC R12 ACTCTAGGTGGAATGTCCGTG	55-57	350-1500
<i>HDHD1</i>	F TCATCCACATGCTCTGGTTCC R CTGGGCTTCGTTTCTGTCTC	54	220-1200

Figura 13: Secuencia de oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar *VCX*, *PNPL4A*, *NLGN4* y *HDHD1*

Las condiciones de PCR se calibraron utilizando las siguientes concentraciones finales en un volumen final de 20 µl.

ADN	H ₂ O	BUFFER	Mg ⁺⁺	dNTP's	Oligo F	Oligo R	Taq
2 µl (50 ng)	c.b.p 20 µl	2 µl (1X)	1.5 µl (2 mM)	2 µl (200 µm)	1 µl 0.5 µM	1 µl 0.5 mM	0.1 µl (1U)

Sometidas en un termociclador ThermoLab, bajo las siguientes condiciones de reacción:



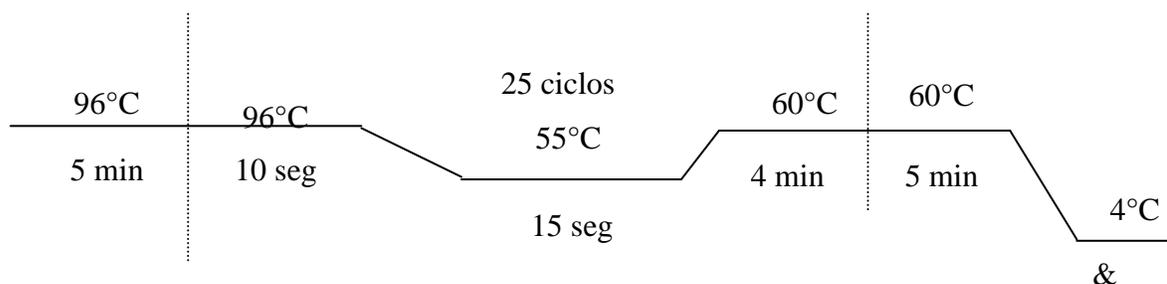
Los amplicones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para confirmar el tamaño deseado del fragmento de 159 pb, comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Confirmado el amplicon se procedió a purificar 5 µl del producto que equivalían a aprox. 200 ng, con 1 µl de Exosap I a 37°C durante 15 min, inactivando la enzima exonucleasa I del kit de la Exosap I a 80°C por 15 min.

IV.- SECUENCIACIÓN

El producto purificado se sometió bajo las siguientes condiciones de PCR para secuenciación

Templado	BIGDYE v3.1	H ₂ O
2 µL	2 µL	c.b.p 20 µL

Sometidas en un termociclador ThermoLab, bajo las siguientes condiciones de reacción:



El producto obtenido se pasa por columnas de Sepadex G-50 previamente hidratadas con agua estéril, se seco el producto y se sometió a un secuenciador ABI 310, con 10 seg de inyección y 30 min de análisis, para obtener los electroferogramas. La secuencia obtenida de los electroferogramas fueron comparados con la secuencia de la base de datos de nucleótido en la web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmar que los productos de PCR eran los deseados.

V.- 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 estaba marcada en el espectro naranja (rojo Texas) e incluía un control interno (CPX) específico para la región centromérica del cromosoma X, el cual se encontraba marcado con un fluorocromo visible en el espectro verde (FIT isotiocianato de fluoresceína).

Las muestras se obtuvieron de la mucosa bucal de los pacientes mediante un raspado del interior de la mejilla izquierda y/ o derecha con ayuda de un abatelenguas esteril, estas muestras se fijaron con metanol/ ácido acético, para después ser deshidratadas con etanol al 70, 85 y 100% en series de 1 min. Inmediatamente después se desnaturalizaron con formamida al 70% a una temperatura de 73°C durante 4 min. Trascurrido el tiempo se volvió a deshidratar con etanol bajo las mismas condiciones y concentraciones antes mencionadas. A la par se realizó una mezcla de 1 µl de sonda comercial + 7 µl de buffer y 2 µl de agua estéril y se desnaturalizó a 73°C por 5 min. Desnaturalizada la sonda y deshidratada la muestra se procedió a hibridar la muestra durante 24 hrs a 37°C. Posteriormente se eliminó la marca inespecífica, es decir el fluorocromo (FIT o rojo Texas) que no hibridó con las células epiteliales del raspado bucal de los pacientes, con lavados de 2XSSC y 0.4% NP-40 a 73°C durante 2 min por dos series. Se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min. Para su visualización se utilizó un microscopio de epi-fluorescencia con lámpara de mercurio y filtros de longitud de onda de 400- 560 nm. La muestra se contratiñó con 5 µl de DAPI II. Con esta metodología se identificó el estado de portadoras de las mujeres y se confirmó la delección total del gen STS en pacientes varones.

RESULTADOS

Para realizar el banco de ADN de los pacientes, me apoyé con la parte del área médica (médicos genetistas) que les realizaron la historia clínica a los pacientes y familiares, mediante el vaciado de datos clínicos y genealógicos determinaban si eran candidatos para la extracción sanguínea

Clínicamente los pacientes presentaban escamas adherentes, regulares y oscuras que respetaban cara, palmas de las manos y plantas de los pies y la mayoría de ellos manifestaban las escamas en las extremidades superiores que eran evidentes cuando se les tomaba la muestra, como se aprecia en la Figura 14.

Ningún paciente presentó actividad de la sulfatasa de esteroides (0.00 pmoles/mg proteína/h) con lo que se confirmó el diagnóstico de ILX. El análisis mediante FISH mostró ausencia de hibridación con la sonda STS lo que indicó la pérdida del gen *STS* como se muestra en la Figura 15.



Figura 14. Paciente con manifestación clínica de ILX, observándose las escamas oscuras, en el abdomen y extremidades superiores e inferiores.

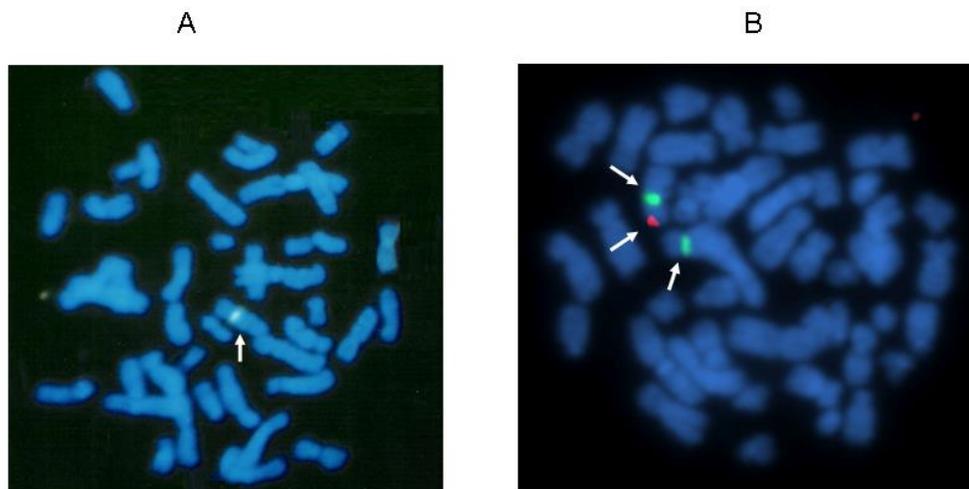


Figura 15. Análisis mediante FISH con la sonda LSI del gen *STS*. A: Metafase de un paciente con deleción del gen *STS*, la flecha indica la hibridación con la sonda centromérica del cromosoma X utilizada como control interno (color verde) con base a la nomenclatura ISCN se denotaría: ish r(X)(p22.3)(STS-,wcpX+). B: Metafase de una portadora hermana de un paciente con ILX, la flecha indica la señal en rojo de la hibridación del gen *STS*, únicamente se aprecia una señal ya que el otro cromosoma X ha perdido el gen, por lo que la hermana era portadora de la deleción. Las flechas que muestran la señal en verde indican la hibridación con la sonda centromérica del cromosoma X utilizada como control interno.

Para confirmar la deleción total del gen *STS* se llevó a cabo una PCR de punto final amplificando los extremos 5' y 3' del gen *STS* (exón 1 y exón 10), para observar los productos se realizó electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la Figura 16.

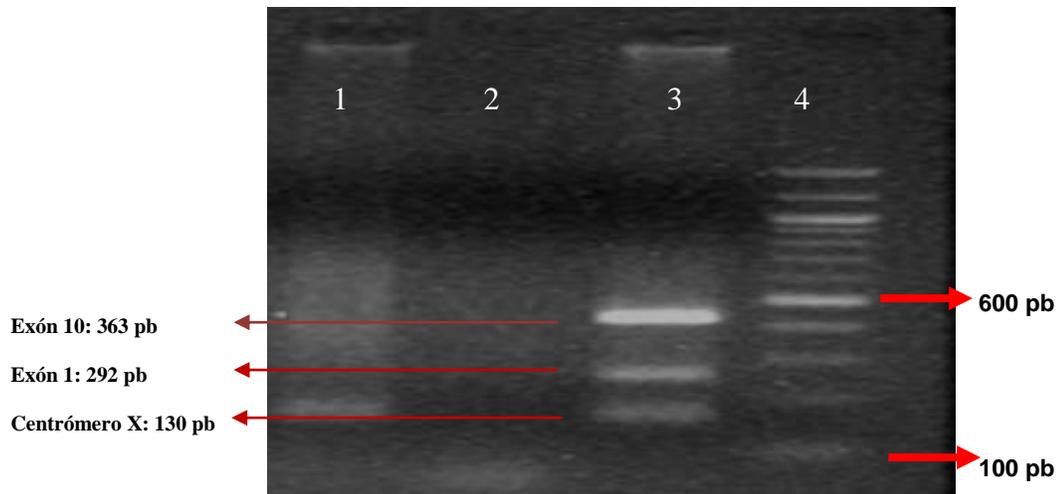


Figura 16: Carril (1), paciente donde se aprecia la delección del los extremos del gen STS (exón 1-10), pero si la amplificación de la región centromérica del cromosoma X, carril (2) control interno (blanco de reacción) X, carril (3) control sano se aprecia la región centromérica de X (130pb) exón 1 (292pb) y el exón 10 (363pb), carril (d) marcador de peso molecular de 100 pb

Después de confirmar la delección se procedió a tamizar las regiones flanqueadoras marcadas en los rectángulos de color rosa que se muestran en la Figura 17. Empezando a amplificar mediante PCR de punto final los marcadores DXS que contienen la secuencia CRI-S232 (DXS1139, DXS237, DXS278) como se observa en las Figuras 18 y 19.

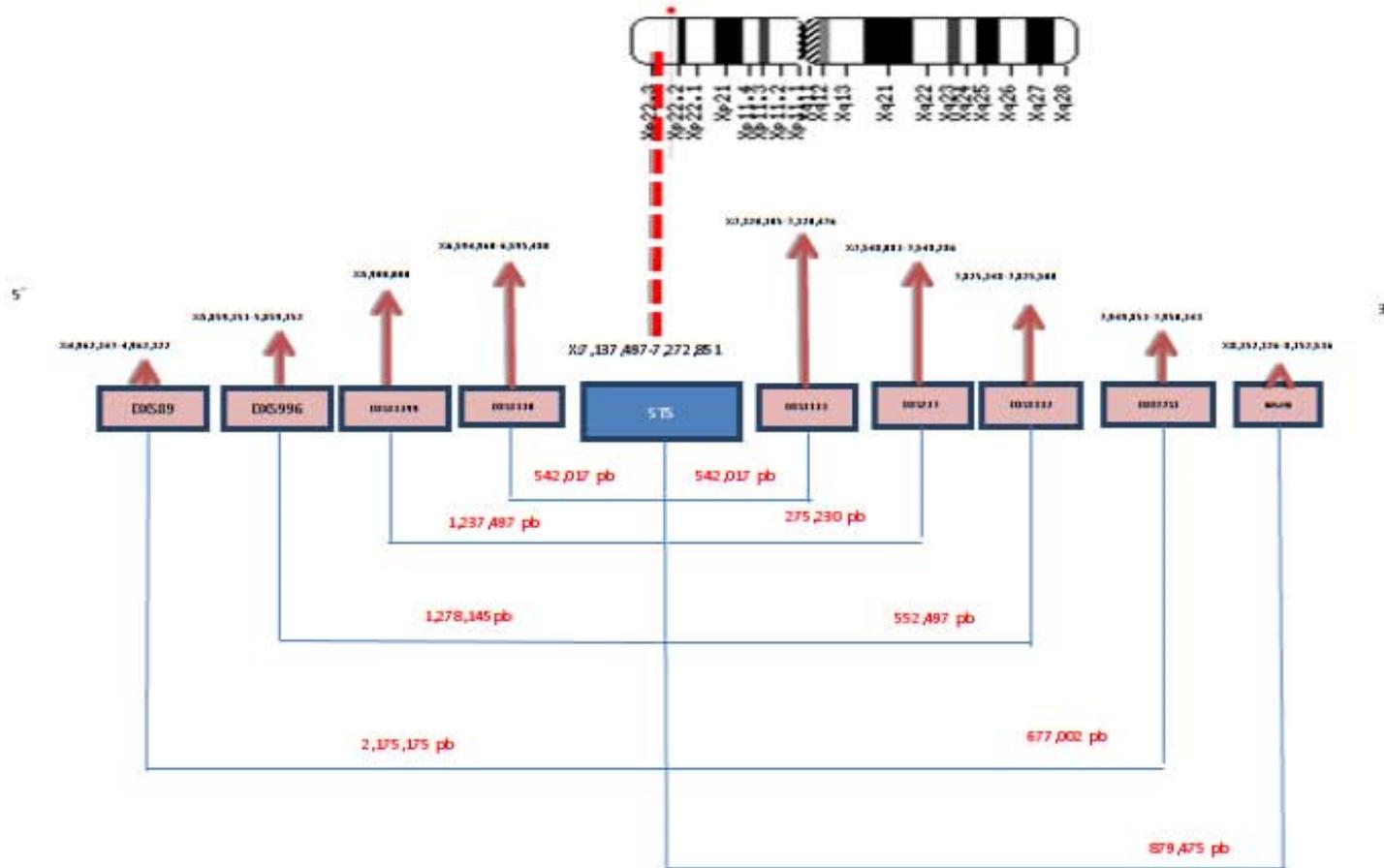


Figura 17: Representación esquemática de las posiciones de los marcadores DXS que flanquean al gen STS y las distancias en pb. Cabe mencionar DXS 1139, DXS237, DXS2251 y DXS278 contienen secuencias CRIS-232

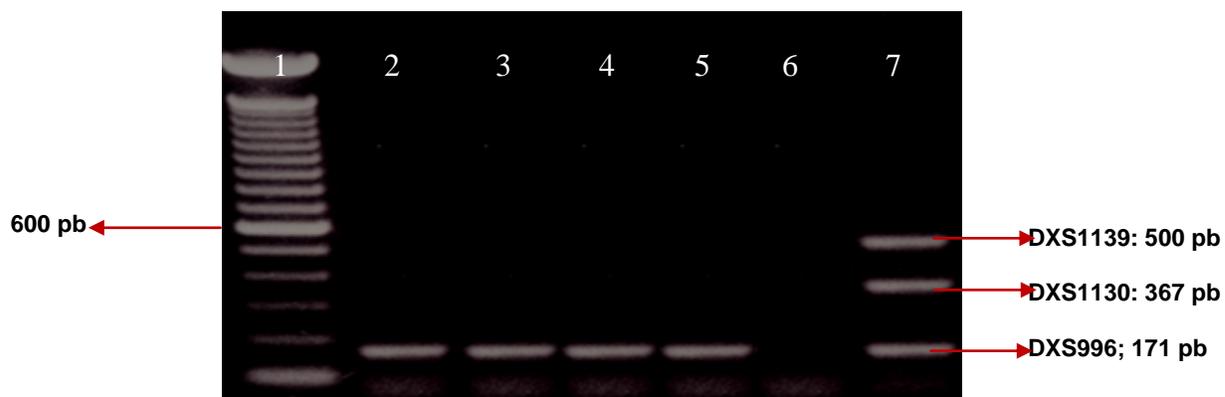


Figura 18: Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, del carril 2 al 5 pacientes que portan la delección de DXS1130 y DXS1139 y que tienen la región DXS996, carril 6 control negativo o blanco de reacción, carril 7 control sano – ADN que amplifica los tres marcadores DXS-.

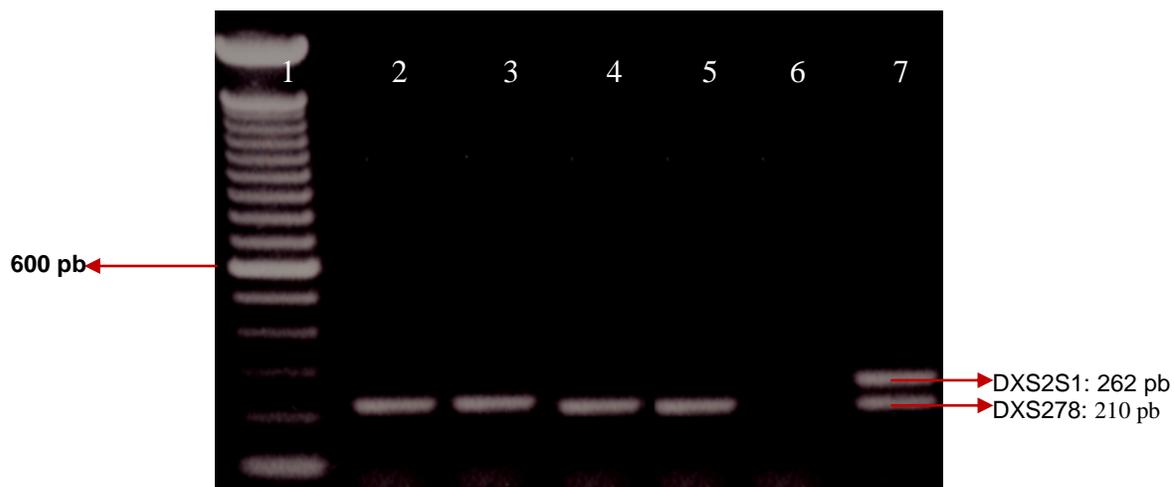


Figura 19: Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, carriles del 2 al 5 pacientes que portan la delección de DXS2S1 pero tienen el marcador DXS 278 del extremo 3'adyacentes al gen STS, carril 6 control negativo o blanco de reacción y carril 7 amplificación de los marcadores DXS22S1 y DXS278 de una muestra de ADN de control sano.

Con los resultados de las figuras 18 y 19 se detectó que el 51.2 % de los pacientes con Ictiosis ligada al cromosoma X (ILX) portan la deleción más frecuente que involucran los marcadores que contienen las regiones CRIS-232, en el 40 % la ruptura también incluye CRIS-232 en los marcadores DXS1139 rio arriba y rio abajo DXS278, como se muestra en la figura 20.

n	DSX 89	DXS 996	DXS 1139	DXS 1130	STS	DXS 1131	DXS 237	DXS 1132	DXS 22S1	DXS 278	DXS 1134
64	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
50	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Figura 20: Representación del patrón de ruptura en el 91.2% de los pacientes, donde se involucran la deleción de los marcadores DXS1139 en el extremo 5' y la deleción de DXS22S1 o DXS278 del extremo 3', regiones que contienen secuencias CRI-S232, por lo que el mecanismo de deleción de 114 de los pacientes es debido a la recombinación homologo desigual previamente reportada por Jimenez-Vaca y cols.

El tamaño de muestra fue de 125 pacientes no relacionados genéticamente y 114 mostraron la deleción más común mencionada anteriormente, sin embargo 11 pacientes que se listan en la figura 21 portan un patrón de ruptura diferente por lo que para identificarlo se realizo PCR de punto final de: *PNLP4A*, *VCXCp*, *VCXCd*, *DXS7470* y *KALL* y rio arriba (5') *HDHD1*, *VCXAd*, *VCXAp*, *NLGN4*. Resultados que revelaron que la ruptura no involucra regiones con contenido CRI-S232.

	DXS	DXS				DXS		DXS	STS	'DXS	DXS	DXS		DXS	DXS	DXS			DXS	
	89	996	NLGN4	VCXAP	VCXAD	1139	HDHD1	1130	5'--3	1131	237	1132	PNLP4A	2251	278	1134	VCXCD	VCXCP	7470	KALL
1	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
9	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
10	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 21. Cuadro que muestra la delección en los 11 pacientes que portan ruptura.

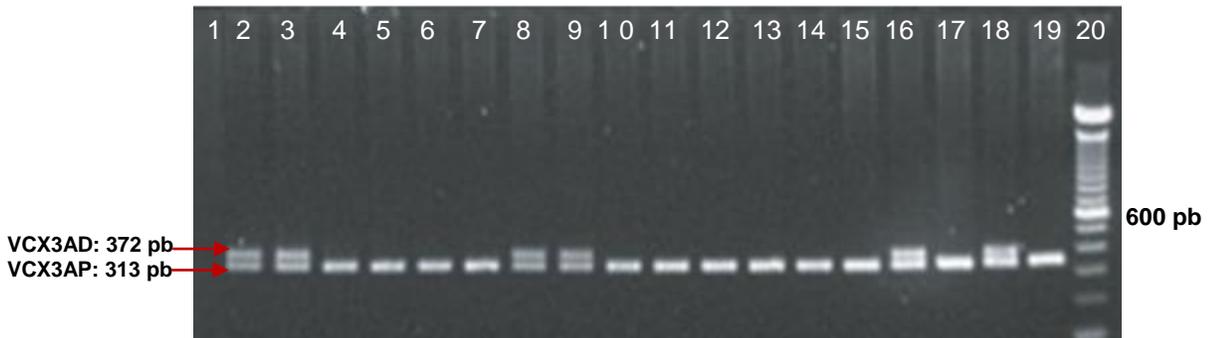


Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se muestra la delección del VCXA distal y presencia de VCX3A en los carriles 4,5, 6,7, 10-15,17 y 19Ñ los carriles 2,3, 8,9 16 y 18 los pacientes muestran tanto VCXAdistal como proximal, el carril 1 es el control negativo o blanco de reacción, en el carril 20 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

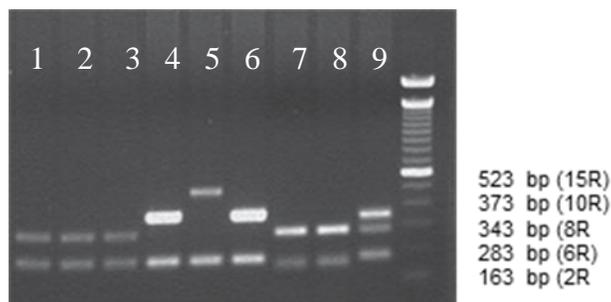


Figura 23: Electroforesis en gen de agarosa al 1.5% donde se muestra la región RU1. Bandas (283 -523 pb) representan genes de la familia VCX con 6-15 repetidos. Sólo ocho pacientes con ictiosis ligada al X se muestran en la fortografía. En los pacientes sólo se observan dos bandas y corresponden a VCX2(163 pb) y VCX3B (283, 343, 373 y 523 pb), el número de repeticiones. control masculino (carril 9)



Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observa parte de la región codificante del gen *HDHD1* (580 pb), en el carril 1: es el blanco de reacción o control negativo en el carril 2 paciente 1 de la figura 21 donde se aprecia la delección del *HDHD1*, amplificando solo el control interno correspondiente a la región centromérica de I cromosoma X, carriles del 3 al 13 pacientes que amplifican el gen *HDHD1* y región centromérica de X, carril 14 control sano que amplifica ambas regiones y carril 15 marcador de peso molecular de 100 pb.

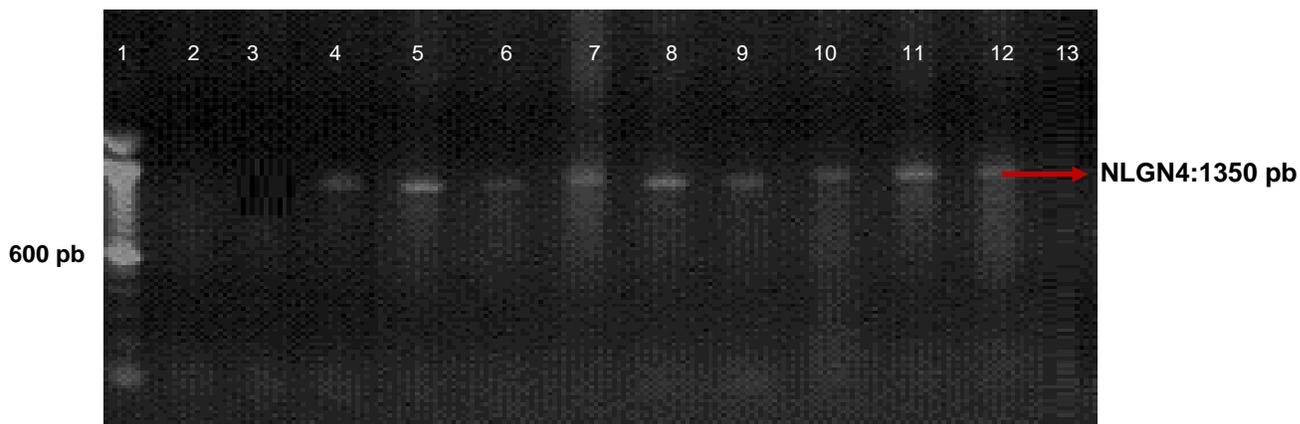


Figura 25 : Electroforesis en gel de agarosa donde se observa parte de la región codificante del gen *NLGN4*(1350 pb), carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 y 3 corresponden a los pacientes 1 y 2 de la Figura 21, donde se aprecia la delección del *NLGN4*, del carril 4 al 11 son el resto de los pacientes de la figura 21 que si tienen el gen, el carril 12 es un control sano y carril 13 control negativo o blanco de reacción.

DISCUSIÓN

Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se presenta fenotípicamente como escamas en el estrato córneo. Con base en la literatura se clasifican en 5 tipos más frecuentes (la bulosa, lamelar, vulgar, eritodermia ictiosiforme congénico y la ligada al cromosoma X).

Alrededor de 90 % de los pacientes con ILX presentan delección total del gen STS y secuencias flanqueadoras. Se ha propuesto que el mecanismo que genera este arreglo molecular es la recombinación no homóloga desigual entre secuencias repetidas ubicadas en el brazo corto del cromosoma en la región Xp22.3 ⁽³²⁻³⁷⁾. Y con base en la literatura internacional estas secuencias repetidas denominadas G1.3 y CRIS-232 ^(18,37-39) son altamente polimórficas, aunque en menor proporción; utilizando una sonda dirigida a CRI-S232 hibrida en la región 5' con DXS1139 (CRI-S232A2) y en la región flanqueadora 3' con DXS237, DXF22S1 (G1.3), DXS278 (CRI-S232B2), .CRI-S232 presenta una secuencia de 7Kb y se organiza en cuatro regiones designadas como a,b,c,d; la secuenciación de b y c revelan que estas contienen VNTRs, designados como elementos RU2 y RU1 respectivamente, con alto contenido de GC en las regiones hipervariables en los loci del cromosoma X _(36,38,43-49) Por lo que apoyados en estudios previos (Jimenez – Vaca y cols, 2001) la mayoría de los pacientes analizados (87.69% n= 114). En el presente trabajo presentaron el mismo patrón de delección, apoyando el mecanismo de recombinación homóloga desigual, el cual provocó la delección en los 114 pacientes analizados.

Sin embargo, en 13% de los pacientes (n=11) parece no aplicar el postulado de la recombinación homóloga desigual como causa de la delección del gen STS en la ILX, ya que la ruptura que generó la pérdida del gen STS y secuencias flanqueadoras no

dependió totalmente del sitio de ruptura. El desplazamiento de la polimerasa se evidencia fuertemente en el dúplex de las unidades repetidas largas, lo que sugiere que secuencias no en tandem pueden también inducir el deslizamiento de la polimerasa⁽⁷⁵⁻⁷⁹⁾. Consideramos que el mecanismo de deslizamiento de la polimerasa explica las rupturas de 9 de nuestros pacientes debido a que no están presentes las secuencias CRIS-232 como se muestra en la figura 5 y 6. Los pacientes 1 al 5 presentan una ruptura a partir del exón 1 del gen *STS* hasta la región DXS1131, que no incluye las secuencias CRIS-232. Cabe mencionar que esta deleción es de las más pequeñas que se detectaron en los pacientes que se analizaron (alrededor de 0,183 Mb – figura 7 y 17). En los pacientes 7 y 8 el patrón de deleción tampoco involucró regiones CRIS-232 ya que la ruptura fue del exón 1 del gen *STS* hasta la región DXS1134 (abarcando aprox. 1.113 Mb). El paciente 10 presentó la ruptura entre DXS1130 hasta DXS1131 río arriba (perdiendo aprox. 0.73 Mb) y por último el paciente 11 abarcó la deleción a partir de DXS1130 hasta DXS1132 (1.23 Mb) como se puede apreciar en las figuras 7 y 17.

Por otro lado para tratar de explicar la deleción de los pacientes 6 y 9 que involucraron *VCXa* y/ o *VCXC*, debemos considerar las secuencias *CRI-S232*, presentes en estos genes, involucrando la recombinación no homóloga desigual. Cabe mencionar que esta secuencia tiene fragmentos polimórficos en el brazo corto del cromosoma X y monomórficos en el cromosoma Y⁽¹⁶⁻²⁵⁾.

Los 11 pacientes de interés mostraron deleción de *VCXA* en la región 5'. Con base en estudios previos en 2008 este gen no ha sido asociado en pacientes mexicanos con ILX y retraso mental. ⁽⁶³⁾ En un esfuerzo para descartar o apoyar esta posibilidad en los pacientes analizados, se estudiaron 80 pacientes con ILX no relacionados reportando inteligencia normal evaluado con la WAIS-R o WISC-R, prueba aplicada por un especialista (psicólogo clínico). Aunque no era en un principio uno de los objetivos, pero basada en la literatura reciente a partir del 2011 en donde se ha relacionado una fuerte

importancia del cluster Xp22.3 con trastornos mentales decidimos analizar la presencia y/o ausencia de los genes *HDHD1* y *NLGN4* río arriba, mediante PCR de punto final, estando ausentes *NLGN4* y *HDHD1* en los pacientes número uno y dos (Figura 21) que aunque mostraron IQ normal si presentaron datos de hiperactividad, sustentada en la literatura la cual ha demostrado que los pacientes con delección o mutación en el gen *STS* pueden presentar un mayor riesgo de déficit de atención (TDAH) ya que la enzima *SE* actúa desulfatando la dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S) a dehidroepiandrosterona (DHEA). Tanto La DHEA y DHEA-S son neuroesteroides con efectos en varios procesos neurofisiológicos y del comportamiento con una relación inversa entre los niveles de DHEA en la sangre y la sintomatología clínica de los niños con TDAH, con base a la historia clínica referida por la madre que está asentada en el expediente del paciente y el diagnóstico del médico especialista y psicólogo ⁽⁸⁰⁾. Además de que las neuroliginas y neuroxinas son proteínas de superficie celular formando parte de la señalización transináptica, son complejos de adhesión que pueden dar lugar a la formación de estructuras presinápticas en las células no neuronales y que son cruciales para la sináptogenesis. Esto podría explicar el déficit de atención; sin embargo, la presencia del gen *VCXA* evitó la presencia del retraso mental en estos pacientes.

Con respecto al paciente uno el cual involucró la delección de *HDHD1*, inicialmente identificado como gen *GS1* (Figura 10) y asociado a la presencia de *ILX* y criptorquidia. Dicho paciente no tuvo criptorquidia por lo que deben existir otros factores que condicionen dicha alteración ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾. Cabe mencionar que la ausencia de la actividad de 5'-PsiMPasa al parecer juega un papel en la génesis de criptorquidia que reporta el expediente clínico y el desarrollo de cáncer de testículo. Por lo que creemos sería interesante estudiar si la actividad de 5'-PsiMPasa en pacientes con *ILX* se asocia a la presencia de criptorquidia o cáncer de testículos ⁽⁷⁷⁻⁷⁵⁾. Aunque hasta la fecha no hay evidencia de la relación en tumores de testículo y criptorquidia, al menos en pacientes con

ILX, ya sea por delección total o mutaciones puntuales del gen *STS* o en deficiencia múltiple de las sulfatasas.

En estos 11 pacientes con rupturas heterogéneas río abajo ninguno involucró la delección del gen *PNLPA4* (GS2), el cual se ha sugerido que tiene relevancia en la maduración cerebral ya que representa una variedad enzimática implicada en el metabolismo lipoproteico dada su actividad como tri-acil-glicerol-lipasa y acil-glicerol-transacilasa y en la regulación de los niveles celulares del ácido transretinoico. *PNPLA4* tiene un papel fundamental en el control de la homeostasis de los lípidos y la energía en los organismos superiores, sin embargo el papel del GS2 en la ILX aún no está definido ⁽⁸¹⁻⁸³⁾

CONCLUSIONES.

El mecanismo de recombinación no homóloga desigual no es el único mecanismo implicado en la delección del gen *STS* y regiones adyacentes.

El deslizamiento de la polimerasa puede ser una explicación a las rupturas heterogéneas.

La relación genotipo-fenotipo en el cluster Xp22.3 debe de estudiarse con más énfasis ya que con base en la literatura reciente aún no se ha elucidado completamente la relación con los genes *PNLP4*, *NLGN4* y *HDHD1*

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cockayne EA. Inherited Abnormalities of the Skin and Its Appendages. London: Oxford University Press, 1933.
- 2.- Wells RS, Kerr CB. Genetic Classification of ichthyosis. Arch Dermatol 1965; 92: 1-6.
- 3.- Shwayder T, Ott F. All about ichthyosis. Pediatric Clin North Am 1991; 38: 597-602
- 4.- Wells RS, Kerr CB. The Histology of Ichthyosis. J Invest Dermatol 1966; 46: 530-5.
- 5.- Ballabio A, Beaudet A, Sly W, Scriver Ch. 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; 1:947-49.
- 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, Lykkesfeldt 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 variants in ichthyosis. Am J Hum Genet 1967; 19 (4): 575-85.
- 11.- Shapiro LJ. Adv. Human Genetic. 1985; 14: 331-381.
- 12.- Shapiro LJ, Buxman MM, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. Lancet 1978; 2: 756.

- 13.- Ballabio A, G. Parenti, R. Carrozzo, G. Sebastio, G. Andria, V. Buckle, et al., Isolation and characterization of a steroid sulfatase cDNA clone: genomic deletions in patients with X-chromosome-linked ichthyosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; 84: 4519–4523.
- 14.- Berger E.A, Shapiro L,J. Metabolism of 3 H-Dehydroepiandroterone sulphate by subjects with steroid sulphatase deficiency. *J inherit Metab Dis*, 1998;11:403
- 15.- French AP, Warren JC. Properties of steroid sulfatase and arylsulfatase activities of human placenta *Biochem J*,1969; 105: 410-14.
- 16.- Vaccaro AM, Salviolo R, Renola I. Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme*. 1987; 37:115-26.
- 17.- G.R.J. Burns, Purification and partial characterization of arylsulphatase C from human placental microsomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1983; 759: 199– 204.
1987; 7: 115.
- 18.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Tagart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell* 1987; 49:443.
- 19.- C. Stein, A. Hille, J. Seidel, S. Rijnbout, A. Waheed, B. Schmidt, H. Gueze, K. von Figura, Cloning and expression of human steroid sulfatase, *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13865– 13872.
- 20.- F.G. Hernandez-Guzman, T. Higashiyama, Y. Osawa, D. Ghosh, Purification, characterization and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2001; 78: 441– 50.
- 21.-Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol* 1985, 63: 1127-44.

- 22.-Dibbelt L, Kuss E. Human placental sterylsulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state, analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991;372:173-85.
- 23.-Chang PL, Mueller OT, Lafrenie RM, Varey PA, Rosa EN, Davidson RG, Henry WM, Shows TB. The human arylsulfatase-C isoenzymes: two distinct genes that escape from X inactivation. *Am J Hum Genet* 1990; 46:729-37.
- 24.-Miyakawa Y, Kawano Y, Taniyama K, Mori N. Steroid sulfatase activity in human leukocytes. *Gynecol Obstet Invest* 1994;38: 191-3.
25. Shankaran R, Ameen M, et al. Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta. *Biochim Biophys Acta*, 1991; 1078:251
- 26.- Munroe DG, Chang PL. Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am J Human Genet*, 1987;40:102
- 27.- Daniel WL, Chang PL. Comparison of arylsulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver. *Enzyme*, 1990;43:212
- 28.-Li XM, Alperin ES, Salido E, Gong Y, Yen P, Shapiro LJ. Characterization of the promoter region of human steroid sulfatase: a gene which escapes X inactivation. *Somat Cell Moll Genet* 1996; 22:105-17.
- 29.-Hirato K, Suzuki T, Hondo T, Saito H, Yanahira T. Steroid sulfatase activities in human leukocytes: biochemical and clinical aspects. *Endocrinol Jpn* 1991;38:597-602.
- 30.-Oyama N, Satoh M, Iwatsuki K, Kaeko F: Novel point mutation in the steroid sulfatase gene in patients with X-linked ichthyosis: transfection analysis using the mutated genes. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1195-99,.
- 31.- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Engelhardt JE. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy for cystic fibrosis. *Nat. Genet*. 1994c; 7:362-369.

- 32.-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; (15):3977-3985.
- 33.- 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.
- 34.- 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.
- 35.- Li -X M, Yen PH, Shapiro LJ. Characterization of a low copy repetitive element S232 involved in the generation of frequent deletions of the distal short arm of the human X Chromosome. *Nucleic Acid Res*. 1992; 20 : 1117.
- 36.- Yen PH, Li X -M, Tsai S-P, Jhonson C, et al. Frequent deletions of the human X-chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*. 1990; 61: 603.
- 37.- 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.
- 38.- 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.
- 39.- 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 Ichthyosis in a Mexican Population. *Molecular Medicine*. 2001;72(12):845-849.

- 40.- Petronczki M, Siomos M, Nasmyth. Un Ménage á Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell*. 2003; 112: 423-440.
- 41.- Kunz C and Schär. Meiotic Recombination: Sealing the Partnership at the Junction. *Current Biology*.2004;14: 962-964.
- 42.- McDougall A, Elliot D, Hunter N. Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. *EMBO reports*. 2005;6:2: 120-125.
- 43.- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.
Trends in Genetics. Review 2002;(2) 18:74-81.
- 44.- 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.
- 45.- Cooper DN, Krawcsak M. The slipped mispairing mechanism. *Human Gene Mutation*, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- 46.-Alperin ES, Shapiro LJ: Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20756- 63,.
- 47.-Cuevas Covarrubias S, Koman S, Orozco E, Diaz JC. The biochemical identification of carrier state in mother of sporadic cases of recessive X-linked ichthyosis. *Genet Counsel* 1995;6:103-107.
- 48.- Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class 1- restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1- deleted recombinant adenovirus. *Immunity*. 1994a; 1:433-442.

- 49.- 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 Ictiosis. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:78-9.
- 50.-Basler E, Grompe H, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutation in steroid sulfatase gene of three patients with X-Linked ichthyosis. *Am J Hum Genet.* 1992; 3: 483-91.
- 51.- Valdes Flores M, Jimenez Vaca AL, Kofman Alfaro SH, Cuevas Covarrubias SA. Characterization of a novel point mutation(Arg432His) in X- Linked ichthyosis. *Acta Derm Venereol.* 2001, Jan-Feb;81(1): 54-5.
- 52.- Gonzalez-Huerta LM, Rivera Vega MR, Kofman-Alfaro, Cuevas Covarrubias SA. Novel missense mutation (Arg432Cys) in patient with steroid sulfatase deficiency. *Clin endocrinol.* 2003(Oxf); 59 (2): 263-4.
- 53.- Sugawara T, Shimizu H, Hoshin N, Fujimoto Y, Nakajima A, Fujimoto S. PCR Diagnosis of X- Linked ichthyosis: Identification of a novel mutation(E560P) of steroid sulfatase gene. *Hum Mutat.* 2000 Mar;15:296-303
- 54.- Ghosh D. Mutation in X-Linked ichthyosis disrupt the active site structure of estrone/DHEA sulfatase. *Biochim Biophys Acta.* 2004 (1739): 1-4.
- 55.- Kruger M, Berger C, Wong –Staal F. Use of ribozymes to inhibit gene expresison. *Meth. Enzymol.* 1999; 306: 207-225.
- 56.- Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H. Transduction of a fiber- mutant adenovirus for the HSVtk gene highly augments the cytopathic effect towards gliomas. *Jap. J.Cancer Res.* 2000;91: 1028-1034
- 57.- Smith AE. Viral vector in gene therapy vector. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;55:5493-5498.

- 58.- Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smit SN, Steel DM, Munkonge FM y col. Non-invasive liposomes-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat. Genet.*1993; 5: 135-142.
- 59.- Qing-Rong C, Dhruv K, Sanford A, James M. Liposomes complex to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer nude mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 3308-3312.
- 60.- Mitani K, Graham FL, Caskey CT. Transduction of human bone marrow by adenoviral vector. *Human Gene Ther.* 1994; 5: 941-948.
- 61.- Hodgson J. UK rules out new gene therapy laws. *Nature.*1993; 366: 194.
- 62.-Xiao L, Pauline H,.Characterization of low copy repetitive element S232 involved in the generation of frequent deletions of the distal short arm of the arm of the human X chromosome. *Nuc Acid Res:*1992 20:5;1117-1122
- 63.- Cuevas-Covarrubias SA, González-Huerta LM. Analysis of the VCX3A, VCX2 and VCX3B genes shows that VCX3A gene deletion is not sufficient to result in mental retardation in X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol.* 2008 Mar;158(3):483-6.
- 64.-Saeki H, Kuwata S, Nakagawa H et al. Deletion pattern of the steroid sulphatase gene in Japanese patients with X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol* 1998; 139:96–8.
- 65.- 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. *Int J Dermatol*2000; 39:182–7.
- 66.- Fukami M, Kirsh S, Schiller et al. A member a gene family on Xp22.3, VCX-A, is deleted in patients with X-linked nonspecific mental retardation.*Am J Hum Genet* 2000;67:563-73
- 67.- Jamain, S, et al. Mutation of the X-linked genes encoding neuroligin NLGN3 and

- 68.- Jiao X, Wang Z, Kiledjian M. Identification of an mRNA-decapping regulator implicated in X-linked mental retardation., *Mol Cell*. 2006 Dec 8;24(5):713-22.
- 69.- Hosomi N, Oiso N, Fukai K, Hanada K, Fujita H, Ishii M Deletion of distal promoter of VCXA in a patient with X-linked ichthyosis associated with borderline mental retardation. *J Dermatol Sci*. 2007 Jan;45(1):31-6. Epub 2006 Nov 20
- 70.- Charette, M. and Gray, M. W. (2000) Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life* **49**, 341-351
- 71.- Preumont, A., Snoussi, K., Stroobant, V., Collet, J. F. and Van Schaftingen, E. Molecular identification of pseudouridine-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 2008 **283**, 25238-25246
- 72.- Seidel, A., Brunner, S., Seidel, P., Fritz, G. I. and Herbarth, O. nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *Br. J. Cancer* .2006; **94**, 1726-1733.
- 73.- Preumont A, Rzem R, Vertommen D, Van Schaftingen E. HDHD1, which is often deleted in X-linked ichthyosis, encodes a pseudouridine-5'-phosphatase. *Biochem J*. 2010 Oct 15;431(2):237-44
- 74.- Avdjieva-Tzavella DM, Todorov TP, Todorova AP, Kirov AV, Hadjidekova SP, Rukova BB, Litvinenko IO, Hristova-Naydenova DN, Tincheva RS, Toncheva DI. Analysis of the genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 in Bulgarian patients with autism. *Genet Couns*. 2012;23(4):505-11.

75.- Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH, Butler MG.

Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism.

J Med Genet. 2006 May;43(5):e21

76.- Avdjieva-Tzavella DM, Todorov TP, Todorova AP, Kirov AV, Hadjidekova SP, Rukova BB, Litvinenko IO, Hristova-Naydenova DN, Tincheva RS, Toncheva DI. Analysis of the genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 in Bulgarian patients with autism. Genet Couns. 2012;23(4):505-11.

77.- Lee WC, Salido E, Yen PH Isolation of a new gene GS2 (DXS1283E) from a CpG island between STS and KAL1 on Xp22.3.

78.- Carrascosa-Romero MC, Suela J, Alfaro-Ponce B, Cepillo-Boluda AJ.[X-chromosome-linked ichthyosis associated to epilepsy, hyperactivity, autism and mental retardation, due to the Xp22.31 microdeletion]. Rev Neurol. 2012 Feb 16;54(4):241-8.

79.- Chen Z, Gao X, Lei T, Chen X, Zhou L, Yu A, Lei P, Zhang R, Long H, Yang Z. Molecular characterization, expression and chromosomal localization of porcine PNPLA3 and PNPLA4. Biotechnol Lett. 2011 Jul;33(7):1327-37.

82.- Petronczki M, Siomos M, Nasmyth. The molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. Cell, 2003;112:423-440

83.- Kunz C and Schar. Meiotic Recombination; Sealing the Partnership at the Junction. Current Biology. 2004;14:962-964

84.- McDougall A, Elliot D, Hunter N. Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. EMBO reports. 2005;6:2:120-125

ANEXO

Medical genetics

Atypical X-linked ichthyosis in a patient with a large deletion involving the steroid sulfatase (STS) gene

Luz Gonzalez-Huerta, MD, Jaime Mendiola-Jimenez, MD, Maria Del Moral-Stevenel, MD, Maria Rivera-Vega, MD, and Sergio Cuevas-Covarrubias, MD

From the Servicio de Genética, Hospital General de México, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

Correspondence

Sergio Cuevas-Covarrubias, Dr
Servicio de Genética
Hospital General de México
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Dr. Balmis 148 Col. Doctores C.P. 06726
México D.F.
México
E-mail: sergioa@servidor.unam.mx

Abstract

A 70-year-old male presented with very large, thick, tightly adherent, dark-brown scales on the front of his lower extremities. His face, neck, back, abdomen, upper extremities, flexural areas, palms and soles as well as hair and nails were not involved. Family history was negative for similar lesions. Otherwise, the patient had a normal development. Onset of symptoms occurred during childhood with scales on lower extremities with no more additional features. Treatment included emollients exclusively with partial and temporary remission of cutaneous lesions. Recently, the patient had not received topical or systemic medical treatment. Laboratory investigations were within normal limits.

The patient had undetectable levels of STS activity when compared with normal control (0.00 pmol mg⁻¹ protein h⁻¹) which confirmed the diagnosis of X-linked ichthyosis (XLI). PCR analysis showed deletion of the *STS* gene, markers DXS1139 and DXF22S1 and the 5' end of the *VCX3A* gene.

The patient had scales present on lower extremities only with no medical treatment that corresponded to an unusual clinical manifestation of XLI. Clinical manifestations of XLI are due to a great variety of environmental, genetic and individual factors that should be considered in XLI diagnosis.

Introduction

X-Linked ichthyosis (XLI) is characterized by scaly skin. Generally, the onset of symptoms is at birth or during the first months of life with the presence of dark, regular, adherent, and polygonal scales of skin. Corneal opacities and cryptorchidism in patients and delayed labor in mothers of affected patients are frequently associated features.¹

XLI is caused by steroid sulfatase (STS) deficiency and occurs in one in 2000–6000 males.² The STS enzyme presents an ubiquitous distribution and is capable of hydrolyzing steroid sulfates.³ The *STS* gene codes for the STS enzyme is located on Xp22.3. Most patients with XLI harbor complete deletion of the entire *STS* locus and flanking markers.^{4,5} In this article, we describe a 70-year-old patient with XLI and atypical clinical characteristics as a result of a large deletion involving the *STS* gene.

Patient and Methods

A 70-year-old man presented with very large, thick, tightly adherent, dark-brown scales on the front of the lower extremities. The

face, neck, back, abdomen, upper extremities, flexural areas, palms, and soles, as well as the hair and nails, were not involved (Fig. 1). The family history revealed no affected family members. Otherwise, the patient had a normal development. The onset of the symptoms had occurred during childhood with scales on the lower extremities but no other features. Treatment included emollients exclusively, with partial and temporary remission of the cutaneous lesions. Recently, the patient had not received any topical or systemic medical treatment. STS enzyme assay, DNA extraction, and polymerase chain reaction (PCR) to analyze the *STS* gene and flanking markers (DXS89 → 5'STS-3'STS → DXS1134), and the variable charge, X-linked (*VCX*) gene family, have been described elsewhere.^{5,6} The patient was informed about the characteristics of the study and agreed to participate.

Results and Discussion

The patient showed undetectable levels of STS activity when compared with normal controls (0.00 pmol/mg protein/h). Initial PCR analysis showed no amplification of either end of the *STS* gene or markers DXS1139 and DXF22S1; therefore, the deletion region involved the area from markers DXS1139

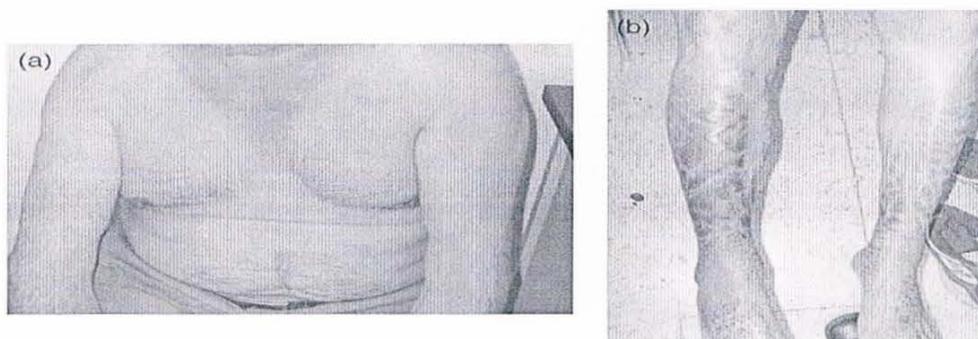


Figure 1 Clinical characteristics of the patient with X-linked ichthyosis. Only the lower extremities were affected

to DXF22S1; this represents one of the most common deletion patterns reported in the literature;^{4,5} subsequent analysis of the VCX gene family showed a deletion involving the VCX3A 5' gene.

The accumulation of cholesterol sulfate (CS) in the stratum corneum of the skin is the principal cause of clinical manifestations in XLI. CS acts as a transcriptional factor of the transglutaminase 1 (TGase1) gene in human keratinocytes.⁷ Apparently, the epidermal changes in XLI are a consequence of TGase1 dysfunction caused by the accumulation of CS.⁸ Two mechanisms have been proposed in the pathogenesis of XLI: (i) interference with the accumulation of CS in the stratum corneum with lamellar phase separation; and (ii) inhibition of corneodesmosome degradation by CS.⁹ STS gene abnormality associated with mutations in the filaggrin (FLG) gene is correlated with the more severe ichthyosis-hyperkeratosis phenotype, suggesting a pathogenic synergy between these genes.¹⁰ In our patient, the absence of STS activity and the extensive deletion of Xp22.3 confirmed the diagnosis of XLI. Even with no medical treatment, the patient showed involvement of the lower extremities only; the rest of the body was unaffected. It is well known that individual skin characteristics and climatic conditions can modify the clinical manifestations in XLI. The clinical characteristics generally do not improve with age and sometimes become more severe; however, our patient presented with mild involvement, which is an unusual clinical manifestation. In addition, our patient had VCX3A gene deletion with no mental retardation; this indicates that the absence of the VCX3A gene is not sufficient to result in mental retardation.

In conclusion, the severity of the clinical manifestations in XLI is influenced by a large variety of environmental, genetic, and individual factors that should be considered in the diagnosis of XLI.

References

- 1 Costagliola C, Fabbrocini G, Illiano GM, et al. Ocular findings in X-linked ichthyosis: a survey on 38 cases. *Ophthalmologica* 1991; 3: 152-155.
- 2 Ingordo V, D'Andria G, Gentile C, et al. Frequency of X-linked ichthyosis in coastal southern Italy: a study on a representative sample of a young male population. *Dermatology* 2003; 207: 148-150.
- 3 Reed MJ, Purohit A, Woo LW, et al. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev* 2005; 26: 171-202.
- 4 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. *Int J Dermatol* 2000; 39: 182-187.
- 5 Jimenez Vaca AL, Valdes-Flores Mdel R, Rivera-Vega MR, et al. Deletion pattern of the STS gene in X-linked ichthyosis in a Mexican population. *Mol Med* 2001; 7: 845-849.
- 6 Van Esch H, Hollanders K, Badisco L, et al. Deletion of VCX-A due to NAHR plays a major role in the occurrence of mental retardation in patients with X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1795-1803.
- 7 Kawabe S, Ikuta T, Ohba M, et al. Cholesterol sulfate activates transcription of transglutaminase 1 gene in normal

- human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1098–1102.
- 8 Nemes Z, Demeny M, Marekiv LN, Fesus L, Steinert PM. Cholesterol 3-sulfate interferes with cornified envelope assembly by diverting transglutaminase 1 activity from the formation of cross-links and esters to the hydrolysis of glutamine. *J Biol Chem* 2000; 275: 2636–2646.
- 9 Elias PM, Crumrine D, Rassner U, et al. Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 314–319.
- 10 Liao H, Waters AJ, Goudie DR, et al. Filaggrin mutations are genetic modifying factors exacerbating X-linked ichthyosis. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2795–2798.