

11216

Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS DE UNA FAMILIA CON DOS CASOS DE DEFICIENCIA MULTIPLE DE SULFATASAS

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORGANISMO REGULADOR

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN GENETICA MEDICA

PRESENTA: MARIA ESTHER BLANCO AGUIRRE



DIRECCION DE ENSEÑANZA



JEFA DEL SERVICIO: DRA. SUSANA KOFMAN
ASESORES DE TESIS: DR. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS
DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA

MEXICO, D. F.

MARZO, 1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

278250



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.

**ANÁLISIS DE UNA FAMILIA CON DOS CASOS DE
DEFICIENCIA MÚLTIPLE DE SULFATASAS***

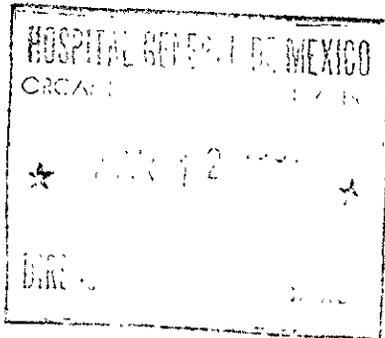
ASESORES DE TESIS:



DR. SEGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS



DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA



**ESTA TESIS FUE REGISTRADA Y REVISADA POR LA DIRECCION DE
INVESTIGACION DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO, S.S.a
CON CLAVE DIC/98/310/04/051**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a todas las personas que de alguna manera contribuyeron para su realización, mi agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre ⁺, que en paz descanse.

A mi hijo Santiago Antonio por su cariño y comprensión.

A mi padre, a mis tíos y sobrinos por su ayuda incondicional.

A la Dra. Susana Kofman por su paciencia, apoyo y enseñanzas que fueron mas allá de la docencia.

Al Dr. Sergio Cuevas, asesor de mi tesis por su amistad y confianza.

A la Dra. Rivera por sus enseñanzas y paciencia.

A Carlos Galaviz, Mónica Aguinaga, Verónica Madrid, Rosy Arana, Elvira Gálvez y Juan Carlos Zenteno, verdaderos amigos.

A todos los que intervinieron en el proceso de enseñanza-aprendizaje, en especial a Alicia Cervantes.

INDICE GENERAL

1.- Resumen	1
2.- Antecedentes	2
3.- Justificación y problema	12
4.- Objetivos	12
5.- Diseño del estudio	12
6.- Pacientes y métodos	13
7.- Análisis estadístico	21
8.- Aspectos éticos y de bioseguridad	21
9.- Resultados	22
10.- Discusión	25
11.- Conclusiones	29
12.- Anexos	
Anexo1: Hoja de vaciamiento de datos	30
Anexo 2: Carta de consentimiento	34
13.- Referencias	35

RESUMEN

La deficiencia múltiple de sulfatasas (DMS) o enfermedad de Austin es una enfermedad metabólica del tipo de las lipidosis. Se manifiesta por ictiosis y alteraciones neurodegenerativas que afectan principalmente a niños y jóvenes en la primera y segunda décadas de la vida. Su patrón de herencia es autosómico-recesivo siendo una entidad rara en la que no se ha determinado su frecuencia. La DMS se debe a un defecto en un factor activador, común a 9 sulfatasas, que lleva a cabo una modificación postraducciona en el dominio activo de dichas enzimas.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de una familia mestiza mexicana con DMS, en la búsqueda de nuevos datos que enriquezcan el conocimiento de la enfermedad.

El diseño del estudio es reporte de casos clínicos.

Los procedimientos incluyeron valoración clínica especializada (neurológica, oftalmológica, audiológica y genética), estudios de gabinete (Rx, EEG, RMN), análisis de la actividad enzimática de las enzimas arilsulfatasas A, B y C. El estudio de la actividad de la enzima FALDH se realizó para el diagnóstico diferencial de DMS. El estudio molecular de STS se llevó a cabo para descartar un síndrome de genes contiguos.

El análisis de los datos obtenidos muestra características clínicas nuevas y ausencia de otras informadas anteriormente. Nuestros pacientes presentan un cuadro clínico atípico de DMS.

ANTECEDENTES

Las enfermedades manifestadas por ictiosis y deterioro neurológico progresivo son heterogéneas. Las características clínicas específicas de estas enfermedades han permitido identificar diferentes patologías, entre ellos el síndrome de Rud caracterizado por ictiosis, deficiencia mental, epilepsia e hipogonadismo; el síndrome de Sjögren-Larsson que presenta como características fenotípicas principales ictiosis laminar, parálisis espástica, retraso mental, retinitis pigmentosa y deterioro neurológico progresivo; el síndrome de Conradi con datos clínicos como alopecia cicatricial, nariz en silla de montar, catarata congénita, ictiosis eritrodérmica y *condrodisplasia punctata*; el síndrome de Kid caracterizado por queratitis, sordera e ictiosis laminar; la enfermedad de Refsum con ictiosis discreta, parálisis flácida progresiva, polineuritis crónica hipertrófica y degeneración retiniana pigmentaria; la deficiencia múltiple de sulfatasas (DMS) que consiste en retraso mental, ataxia, coriorretinitis, alteraciones del tono muscular, alteraciones del lenguaje, datos moderados de enfermedad de depósito e ictiosis. Se ha incluido en este grupo de enfermedades a la deficiencia de sulfatasa esteroidea (STS) que presenta ictiosis asociada en ocasiones a criptorquidia y opacidades corneales. Cuando esta deficiencia se asocia a hipogonadismo, anosmia y retraso mental representa lo que se conoce como un síndrome de genes contiguos (1). La etiología de estas enfermedades es metabólica debida generalmente a alguna deficiencia enzimática, siendo difícil su caracterización bioquímica. Todas presentan una gran similitud clínica y el defecto molecular de estos padecimientos no se ha identificado en muchas ocasiones (2).

Desde 1910 Alzheimer realizando la autopsia de un adulto con una enfermedad neurológica progresiva, encontró material que se teñía metacromáticamente en tejido cerebral adulto, denominando a esta enfermedad leucodistrofia metacromática (LMC). Posteriormente en 1958 Jatzkewitz y Austin en forma independiente describieron un gran exceso de sulfátidos en tejidos de pacientes con LMC. En 1963 Austin reportó la deficiencia de *arilsulfatasa A (ARS-A)* en tejidos de pacientes con LMC y más tarde Mehl y Jatzkewitz en 1964 demostraron en un paciente con LMC atípica, un bloqueo del sulfato de cerebrósido e hicieron una descripción de la deficiencia de un factor estable

al calor, cuya función era aumentar la actividad de ARS-A. En 1965 se describió una variante de LMC con datos de mucopolisacaridosis, pero es Austin en 1973 quien identifica a la deficiencia de dos sulfatasas lisosomales (A y B) y una arilsulfatasa microsomal (ARS-C) como causa de esta variante. Posteriormente, Basner la denomina DMS al encontrar deficientes 7 sulfatasas. Horwitz en 1979 concluyó que este defecto probablemente se debe a una falla en el proceso regulatorio de la producción de sulfatasas (3). Más tarde en 1995, Schmidt confirma este mecanismo de enfermedad en las enzimas ARS-A y arilsulfatasa B (ARS-B), extrapolándolo al residuo de cisteína conservado en las 6 sulfatasas humanas conocidas, incluido dentro de una secuencia de 13 residuos altamente homólogos, 9 de ellos conservados en 5 de 6 sulfatasas (4). Nelson en 1997 logró inmortalizar y caracterizar una línea celular con el defecto molecular, demostrando el defecto al realizar pruebas de complementación en híbridos con deficiencia única y con DMS (5).

La DMS, denominada actualmente sulfatidosis juvenil tipo Austin es una enfermedad autosómica recesiva rara. Se han reportado alrededor de 50 casos (3) y su diagnóstico se realiza con base en la deficiencia de más de 9 sulfatasas (6). Como consecuencia de la deficiencia de estas enzimas, se acumulan sus correspondientes sustratos que corresponden a los sulfatos de glicolípidos, glicosaminoglicanos (GAGs) y esteroides (7).

Las manifestaciones clínicas de la DMS incluyen datos tanto de leucodistrofia metacromática como de mucopolisacaridosis. El deterioro neurológico muestra una expresión variable y la ictiosis se desarrolla a los 2 o 3 años de edad. Los hallazgos oculares incluyen estrabismo, opacidad corneal, atrofia óptica, degeneración retiniana y ocasionalmente se presenta mácula rojo-cereza. Además de las características faciales toscas, se advierte retraso en el desarrollo, hepatoesplenomegalia y anomalías esqueléticas que ocurren en etapa tardía. (7).

En los estudios paraclínicos se encuentran cantidades elevadas de los sulfatos de dermatán y heparán en orina e incremento de las proteínas de LCR en estadios tardíos. En los estudios histopatológicos pueden observarse como datos inconstantes gránulos de Alder-Reilly en médula ósea y en leucocitos de sangre periférica. Los rayos X

muestran datos de disostosis múltiple como son silla turca en "J", aplanamiento de arcos costales, deformidades en acetábulo, esternón, vértebras lumbares en "pico de loro" y falanges ensanchadas. La biopsia de nervios periféricos muestra degeneración metacromática de mielina (3).

La Tomografía axial computarizada (TAC) y/o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) muestra patrones anormales de mielinización y crecimiento ventricular con moderada atrofia cerebral progresiva (3).

El diagnóstico de certeza se realiza al encontrar disminuida la actividad enzimática de las arilsulfatasas (ARSs) A, B y C de líquidos corporales, riñón, cerebro, hígado y otras líneas celulares, aunque teóricamente 9 sulfatasas deben estar deficientes (5).

Se ha intentado clasificar a esta enfermedad por diversos criterios. Uno de ellos es el clínico y se basa en las características tempranas de la LMC (9). Sin embargo, los casos reportados de DMS no permiten esta clasificación, ya que el cuadro clínico inicial puede pasar desapercibido. Por otra parte, las fases clínicas no se han podido correlacionar con las clasificaciones bioquímicas.

Una de las clasificaciones bioquímicas se basó en la corrección del defecto in vitro al añadir tiol-proteasas, denominando grupo I a la deficiencia grave y grupo II a la deficiencia moderada. Lo inconveniente de esta clasificación es que se planteó antes de conocerse el defecto básico de la enfermedad, de manera que en el grupo I se incluían los casos con actividad residual de las ARSs A, B y C menor o igual al 10% de lo normal o una actividad 10 veces menor que el control y en el grupo II los casos con actividad residual de más del 90% o una actividad de la ARS-A 2-3 veces menor y de ARS-B a la mitad de lo normal (10). Otra clasificación bioquímica se realizó con base en la variabilidad bioquímica. El grupo I incluye los casos con deficiencia de las 3 ARSs. El grupo II, en donde se ha encontrado francamente deficiente la actividad de las enzimas ARS-A y ARS-B y la mitad de la actividad de ARS-C o inclusive normal y el grupo III con actividad enzimática de ARS-A semejantes a las de la pseudodeficiencia (niveles intermedios sin manifestaciones neurodegenerativas de LMC) y deficiencias de ARS-B y ARS-C (11).

Las sulfatasas son responsables de activar a los sulfátidos, los cuales son glicolípidos aniónicos esenciales para la integridad de la membrana y pueden participar como cofactores para la Na^+/K^+ -ATPasa y para receptores GABA, serotonina y opiáceos (6). Todos los miembros de la familia de las sulfatasas catalizan la hidrólisis de enlaces éster sulfato (actividad de O-sulfatasa) en glicosaminoglicanos (GAG), sulfolípidos y sulfatos beta-hidroxiesteroides. La mayoría de las sulfatasas están localizadas en lisosomas, donde efectúan en un medio ácido las reacciones de desulfatación, las otras son microsomales y actúan a pH medio (12).

Las ARSs están caracterizadas por su capacidad de hidrolizar éster sulfato de compuestos aromáticos cromogénicos o fluorogénicos, tales como *p*-nitrocatecol-sulfato (*p*-NCS) y el sulfato de 4- metil lumbeliferil (4-MU). Se conocen 6 enzimas de este grupo denominadas de la A a la F (6).

La ARS-A es lisosomal, se encuentra principalmente en hígado, placenta y fibroblastos. Es un polipéptido con peso molecular (PM) de 62 kDa, cuyo cDNA clonado predice una proteína con 507 aminoácidos (aa) con 3 sitios de N-glicosilación, con actividad de hidrolasa del éster-sulfato de los galactosil-cerebrósidos. Su deficiencia aislada produce leucodistrofia metacromática aunque también se ha implicado en algunas enfermedades psiquiátricas y en los efectos neuropatológicos del alcohol (13-14).

La ARS-B es lisosomal y se ha relacionado con el síndrome de Maroteaux-Lamy o mucopolisacaridosis VI. La enzima se ha purificado de placenta humana e hígado donde existe como monómero. Tiene 533 aa, 46 de los cuales corresponden a un guía péptido, presenta gran similitud con otras sulfatasas especialmente en el extremo amino e hidroliza el grupo sulfato de la posición 4 de los residuos N-acetilgalactosamina de los residuos de sulfato de dermatán, sulfato de condroitín y GAG (15).

La ARS-C es conocida como STS. Esta enzima difiere de otros miembros de la familia por su localización microsomal y su actividad a pH neutro. Está implicada en la vía sintética no degradativa de hormonas esteroideas, siendo su principal sustrato natural el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). Además hidroliza *p*-nitrofenilsulfato y el sulfato de 4-MU. La enzima activa es un multímero de subunidades idénticas con PM cada una de ellas de aproximadamente 63 kDa, el agregado más pequeño que tiene

actividad parece ser un dímero de 126 kDa. Por análisis de inactivación de neutrones se encontró uno con PM de 533 kDa y por cromatografía otro de 1000 kDa. La enzima parece ser una glicoproteína, con una vida media de aproximadamente 4 días. Los estudios de secuenciación predicen una forma madura de 583 aminoácidos (aa) con una señal hidrofóbica de 22 aa, la cual es escindida después de la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). Presenta una larga región hidrofóbica así como 2 dominios transmembranales potenciales. Stein propuso un modelo con tres dominios ubicando los extremos carboxilo y amino en los extremos luminales de la membrana (16-17).

Las ARSs D y F se han localizado en RE y la arilsulfatasa E (ARS-E) en aparato de Golgi. El papel fisiológico y los sustratos naturales de las ARSs E y F no han sido definidos, sin embargo, son activas con el sustrato artificial fluorogénico (6). De este grupo, la ARS-E es la única que se ha relacionado con enfermedad (Condrodisplasia punctata) (Tabla 1). Aunque esta enfermedad presenta heterogeneidad genética, la forma ligada al cromosoma X tiene algunas características comunes a la DMS. El producto del gen se ha reconocido como un precursor de 60 kD, sujeto a N-glicosilación con una forma madura de 68 kD. En forma interesante la ARS-E presenta homología con STS en tres de 4 sitios de glicosilación (18-19).

<i>Enzima</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Localización celular</i>	<i>Proteína</i>	<i>Localización del gen</i>
ARS-A	Leucodistrofia metacromática	Lisosomal	507 aa	22q13
ARS-B	Maroteaux-Lamy	Lisosomal	553 aa	5q13-q14
ARS-C	Ictiosis ligada al X	Microsomal	583 aa	Xp 22.3
ARS-D	?	Retículo endoplásmico	*	Xp22.3
ARS-E	Condrodisplasia punctata Lig-X	Aparato de Golgi	594 aa	Xp 22.3
ARS-F	?	Retículo endoplásmico	*	Xp 22.3

Tabla 1: Se muestran algunas características de las ARSs. * Dato no informado

Otras enzimas con actividad de sulfatasa son las sulfatasas de iduronato-2-sulfato, de heparán, de acetilgalactosamina-6-sulfato y de N-acetilglucosamina-6-sulfato (6).

El defecto original de la DMS reside en el gen que modifica postraduccionalmente las sulfatasas dentro de la ruta secretoria (6). El residuo de cisteina modificado se encuentra en una secuencia consenso de 13 aa y puede actuar como un residuo de reconocimiento colineal para la maquinaria que modifica a la cisteina (figura 1).

ARS-A	SLCTPSRAALLTGRL
ARS-B	PLCTPSRSQLLTGRY
STS	PLCTPSRAAFMTGRY
Sulfatasa de N-acetil-glucosamina	ALCCPSRASILTGKY
Sulfatasa de iduronato	AVCAPSRVSFLTGRR
Sulfatasa de N-acetil-galactosamina	PLCSPSRAALLTGRL

Figura 1: Residuos de aminoácidos en común de las sulfatasas humanas

Esta cisteina se ha correlacionado con un novedoso derivado de aminoácido, la formilglicina (FGly) o ácido 2-amino-oxo-propiónico que se encuentra en el sitio predicho para la cisteina. Este residuo es altamente conservado como parte del hexapéptido LV-FGly-X-P-S-R, ubicado en la región amino-terminal del polipéptido y contiene un grupo OH o tiol en el residuo X. El residuo FGly es crítico para la actividad catalítica de la sulfatasa y puede ser generado a partir de cisteina o serina, en sulfatasas de eucariontes y procariontes (20).

Se ha postulado que el mecanismo de oxidación de las sulfatasas ocurre en el RE cuando aún no se conforma la estructura secundaria de la proteína. Puede concebirse como el resultado de una reacción de dos pasos, el primero es una reacción de oxidación que produce un tioaldehído como intermediario, seguida por un paso de

hidrólisis que produce el aldehído y el sulfuro de hidrógeno (Figura 2) (21). Uno de los 2 grupos hidroxilos del modificador acepta el sulfato durante el rompimiento del éster llevando a la formación de un intermediario de la enzima (tioaldehído). El otro hidroxilo es requerido para la subsecuente eliminación del sulfato y la regeneración del grupo aldehído (hidrólisis) (22). El aldehído es parte del sitio catalítico y es probable que actúe como hidruro de aldehído para una rápida desulfatación de la enzima a un pH ácido (23).

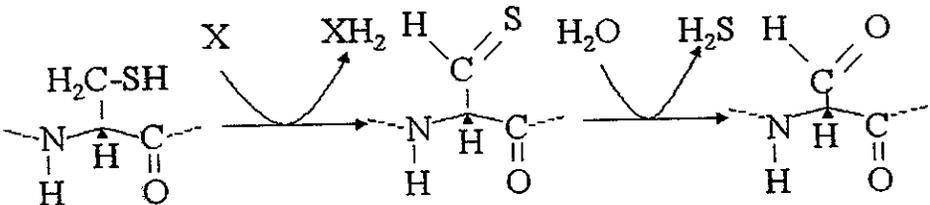


Figura 2: Esquema del mecanismo de reacción postulado para la conversión de cisteína en Fgly.(4)

Los estudios realizados por cristalografía en ARS-B también han sugerido que los residuos conservados en el sitio activo de las sulfatasas, estabilizan el ión calcio y el éster-sulfato en el sitio activo, apoyando el arquetipo de plegamiento en las sulfatasas (Figura 3). Recientemente se observó el mismo efecto en la enzima ARS-A en relación al ión Mg (24-25).

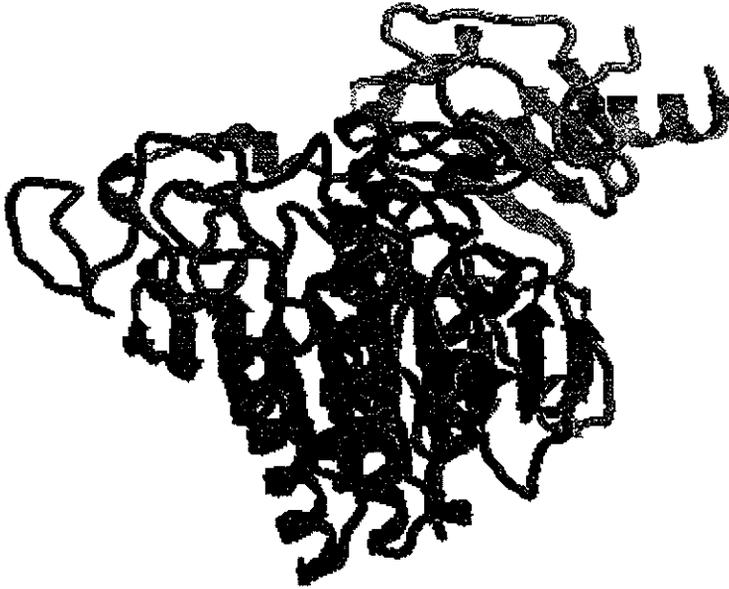


Figura 3: Modelo tridimensional de ARS-B (7)

De las 6 ARSs conocidas, la A y la B, son autosómicas (cromosomas 5 y 22), mientras que las demás están codificadas en Xp22.3 (6).

ARS-A: El gen se localiza en 22q13 y consiste de 8 exones dentro de una región de 3.2 kb. La región 5' no traducida contiene elementos de control corriente arriba típicos de los genes estructurales. No tiene caja TATA ni CAAT y el sitio cap de RNAm se localiza 370 pb corriente arriba del inicio del 1er codón. Más arriba se encuentran 4 secuencias GC localizadas a -10, -40, -50 y -60 pb con posiciones típicas de interacción con el factor de transcripción Sp1 (5). Se han encontrado dos transcritos, de 4 y 3.2 kb y la

diferencia es debida a la iniciación de la transición 5' del sitio cap de las especies de RNAm de 3.2 kb. La secuencia codificante tiene 1518 pb y predice una proteína de 507 aa. Las secuencias de nucleótidos y aa de la ARS-A son altamente conservadas (26).

ARS-B: El gen contiene 8 exones y se localiza en 5q13-q14. Presenta múltiples sitios de inicio y la actividad del promotor se ha estudiado utilizando un fragmento de 398 pb de DNA cuando se expresa transitoriamente en células BHK-21. En este caso se ha utilizado el gen bacteriano de acetiltransferasa de cloramfenicol como reportero. Este promotor presuntivo está localizado en una isla CpG y contiene sitios de unión Sp1 y AP2 pero carece de cajas TATA y CAAT (15,27).

ARS-C/STS: El gen está localizado en Xp22.3. Tiene una estructura completamente distinta. El gen STS se extiende sobre una región de 146 kb, tiene 10 exones y presenta dos regiones que no se transcriben, una en el extremo 5' de 206 pb y otra región 3' de 668 pb intercaladas por una secuencia de marco de lectura abierta de 1683 pb. La señal de poliadenilación se encuentra a 13 pb del inicio de la cola de poli-A. Se han identificado 3 transcritos de RNAm de pesos moleculares diferentes en distintas líneas celulares, como consecuencia de la adición de colas de poli-A de longitud variable. El promotor de STS tiene bajo contenido en GC, carece de sitios de unión para factores de transcripción conocidos. Se han caracterizado varios sitios de inicio de transcripción dentro de una región de 1.3 kb en el extremo 5'. Estos incluyen tres elementos potenciadores URE1, URE2 y URE3 y un elemento represor URE4 (16,28).

El gen STS se transcribe principalmente en placenta, hígado y pulmón y es el único gen que escapa a la inactivación del X que no está asociado con una isla CpG (25). El producto del gen es un polipéptido con masa molecular de 62 kDa y presenta dos sitios de glicosilación (17,28,29).

Los genes de las demás arilsulfatasas están localizadas dentro de un grupo de genes en el brazo corto del cromosoma X humano en la banda Xp22.3. Los 3 miembros identificados son los correspondientes a **ARS-D**, **ARS-E** y **ARS-F** que se expanden en 200 kb de DNA, 150 kb proximales al límite de la región pseudoautosómica. **ARS-D** y **ARS-E** se encuentran en una región de 60 kb proximales a la región de 150 kb del límite pseudoautosómico (PABX). **ARS-D** está dividido en 10 pequeños exones.

mientras que **ARS-E** tiene un exón adicional en el extremo 5' no traducido, ambos genes están separados por 6 kb. **ARS-F** contiene 11 exones. El alineamiento de las **ARS-D**, **ARS-E** y **ARS-F** revela una perfecta conservación de las uniones intrón-exón, ocurriendo el empalme en la misma posición (6, 18, 30).

Aún no se ha logrado identificar al gen que codifica para el factor activador de las sulfatasas.

JUSTIFICACIÓN Y PROBLEMA

En la literatura internacional existen pocos casos reportados de DMS y en México ninguno. Este caso familiar presenta un cuadro clínico atípico aunque la mayoría de los datos observados corresponden a DMS. Consideramos que el estudio clínico-bioquímico completo de nuestros pacientes puede contribuir al conocimiento de la enfermedad.

OBJETIVO

Analizar clínica y bioquímicamente a una familia mexicana con DMS.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Reporte de casos clínicos.

PACIENTES Y METODOS:

I.- Descripción clínica: Se llevó a cabo utilizando una hoja de vaciamiento de datos (Anexo1).

La población estudiada es una familia mestiza mexicana con dos hijos afectados.

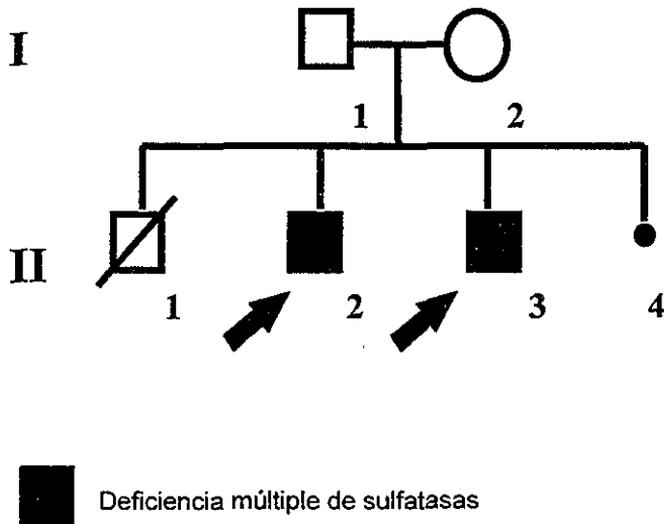


Figura 4: Arbol genealógico



Figura 5: Características faciales de paciente II-2: R J



Figura 6: Características faciales de paciente II-3: R W

PACIENTES

II-2 RJ: Producto de la segunda gesta entre padres jóvenes no consanguíneos, padre originario de D.F., madre originaria del edo. de Sinaloa. Obtenido por parto eutócico con peso de 3820 g, talla de 51 cm, lloró al nacer, sin datos de sufrimiento fetal o hipoxia neonatal. Su crecimiento y desarrollo fueron normales hasta el año de edad en que presentó un retroceso en sus habilidades. Inicia el padecimiento a los 5 años de edad con ictiosis en extremidades e hipotonía, así como retraso psicomotor, marcha peculiar y dislalia. A la edad de 7 años presentó criptorquidia manejada con orquidopexia bilateral. A los 13 años de edad se diagnosticó retraso en el desarrollo sexual y se manejó con tratamiento hormonal sustitutivo durante 1 año. La evolución es inicialmente rápidamente progresiva y posteriormente es lenta, se revisa a la edad de 22 años. A la exploración física presenta marcha atáxica, facies peculiar, lenguaje articulado de 6 vocablos. Peso de 53 kg, talla de 1.63 m, cabello abundante, implantación alta de cabello en región frontal, cráneo normocéfalo, sinofris, ojos simétricos con ptosis leve, pestañas abundantes dirigidas hacia abajo, nariz grande con punta bulbosa y tricostasis espinulosa, filtrum normal, labios gruesos, tendencia a mantener la boca abierta, paladar alto, úvula corta, maloclusión dental, alteraciones en esmalte, tórax en tonel, no visceromegalias, extremidades simétricas con pulgares de implantación proximal, primer orje ancho bilateral, columna con ligera escoliosis hacia la derecha, espasticidad, ROT aumentados y Babinsky (-). El examen neurológico reportó paresia espástica. Lesiones ictiosiformes de escama fina oscura en cuello y axilas y escama gruesa oscura en abdomen inferior y regiones de flexión.

En fondo de ojo se observa atrofia coroidea bilateral manifestada por puntillero grisáceo alrededor de la mácula, reportada como atrofia tapetoretiniana. El EEG se reporta como anormal por actividad cortico-subcortical moderada. La RMN muestra atrofia cortico-subcortical difusa acentuada con dilatación ventricular compensatoria simétrica, hiperintensidad de localización perifrontal y occipital a ventrículos laterales. Atrofia olivopontocerebelosa. La RMN se interpretó como enfermedad desmielinizante en fases iniciales de evolución. La biopsia de piel se reporta con hiperqueratosis ortoqueratósica marcada, epidermis con acantosis moderada irregular con zonas de alargamiento y ensanchamiento, anastomosis de los procesos interpapilares. Hipogranulosis marcada

con áreas de ausencia de la capa granulosa, hiperpigmentación basal y los haces de colágena densos con discretos focos de infiltrado inflamatorio de predominio perivascular, datos compatibles con ictiosis ligada al X.

Cariotipo con BG 46, XY, sin alteraciones numéricas ni estructurales.

II-3 RW: Producto de la tercera gesta, obtenido por parto eutócico a los 9 meses de gestación con peso de 3100 g, sin antecedentes de hipoxia perinatal, presentó retraso psicomotor evidenciado después del año de edad. En etapa pre-escolar manifiesta lesiones ictiosiformes en extremidades y dificultades de aprendizaje. Acude a la edad de 17 años junto con su hermano por ictiosis y deterioro neurológico progresivo. A la EF presenta facies peculiar y marcha atáxica, no articula palabras. Peso de 40.5 kg, talla de 1.59 m, brazada 1.68 m, PC 54 cm, SS 75 cm, SI 84 cm, implantación adecuada de cabello, cráneo normocéfalo, sinofris, pestañas rizadas abundantes, nariz regular con tricostasis espinulosa, boca pequeña, labios gruesos, paladar alto, úvula corta, maloclusión dental, alteraciones en esmalte, cuello cilíndrico, tórax en tonel, no visceromegalias, genitales masculinos normales, extremidades simétricas espásticas, pulgares de implantación proximal, primer orjejo ancho bilateral, columna vertebral con escoliosis dorsal dirigida a la derecha. Se determina paresia espástica. Las lesiones de ictiosis presentan la misma localización que su hermano y son de escama gruesa y fina. Se observan los mismos hallazgos en fondo de ojo y EEG que en RJ. La RMN reporta mismos hallazgos más gran quiste aracnoideo retrocerebeloso de 30 mm x 60 mm. La biopsia de piel se reporta como epidermis con hiperqueratosis ortoqueratósica marcada, acantosis moderada irregular con ausencia del estrato granuloso. Hiperpigmentación de la capa basal. En el estroma los haces de colágena se observan densos y un tanto homogeneizados con aparente disminución en las fibras elásticas. Compatible con ictiosis ligada al X.

Cariotipo con BG 46, XY, sin alteraciones numéricas ni estructurales.

II.- Mucopolisacáridos en orina

Se realizó en 4 muestras de orina congelada de cada paciente, previa medición de la concentración de creatinina, la cual debe ser mayor a 0.3 mg/ml.

Para la prueba de albúmina ácida se utilizó un tubo estándar (no. 1) en donde se colocó ácido nítrico 2.63 N y agua y un tubo problema (no. 2) para la muestra de orina más dos gotas de HCl. A ambos tubos se les añadió albúmina ácida, preparada en una solución de acetato de sodio y se agitó, esperando de 15 a 20 minutos. Un precipitado turbio es interpretado como resultado positivo habitualmente.

Para la prueba de azul de toluidina se disolvió azul de toluidina en una solución de acetona y agua agregándose ácido acético al 10%. Con esta solución se humidificó el papel filtro Whatman No. 1 en donde se colocó la orina gota por gota. Una mancha morada contra el fondo del papel filtro que es azul da un resultado positivo. Un débil margen metacromático alrededor del halo es considerado negativo (31).

III.- STS

1.- Actividad de STS:

Se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica, extrayendo 10 ml de sangre venosa de venas antecubitales en jeringa estéril utilizando EDTA como anticoagulante. Al suero sanguíneo separado por centrifugación a 1400 r.p.m. se añadió cloruro de amonio, se permitió reposar por 3-5 minutos y posteriormente se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 5 minutos para lavar el botón de leucocitos obtenido. Este proceso de lavado se repitió por 3 ocasiones. El ensayo enzimático se realizó con el botón de leucocitos homogeneizado en buffer-tris 0.014 M helado (pH 7) utilizando un polytron con vástago del no. 10 para liberar estructuras microsomales en dos ciclos de 20 y 10 segundos respectivamente. Al incubar la reacción, el sustrato utilizado fue sulfato de 7-(³H)- dehidroepiandrosterona y el producto de la hidrólisis se recuperó con benceno, agitándose vigorosamente en vortex durante 2 minutos y centrifugándose 5 minutos a 2500 r.p.m. Posteriormente la fase superior (sobrenadante de benceno) fue leída en un espectrómetro de centelleo Packard Tri-carb modelo 3255. Como valor de referencia se utilizó el método de Bradford para determinación de proteínas y cada uno de los ensayos se realizó por duplicado (32).

2.- Estudio molecular de STS:

Se obtuvo DNA a partir de leucocitos de sangre periférica, agregando a cada muestra amortiguador de lisis de eritrocitos (triton 1% 10 mM y sacarosa 22mM), se disolvió y centrifugó hasta obtener un botón de leucocitos libre de eritrocitos. Después el botón de leucocitos se resuspendió en NaCl 5nM, se añadió SDS al 10% agitándose durante 10 minutos y se centrifugó a 12,000 r.p.m. a 4° durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos estériles y se agregaron 2 volúmenes de etanol frío al 100% para precipitar el DNA, el cual fue recogido con una pipeta Pasteur, lavado en etanol al 70%, secado, redisolto en agua y procesado después de la extracción.

El DNA extraído se analizó por técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa), utilizando el siguiente material: DNA, Taq polimerasa, buffer, mezcla de dNTPs, cloruro de magnesio, termociclador y un par de oligonucleótidos que amplifican 2 regiones, una correspondiente al exón 1 y la otra correspondiente al exón 10 del gen de STS.

Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el exón 1 de STS:

F-5'GGCCTAGAAGAAGGTTGAAGGTCCC,
R-5'AAGAGGTTGGATGAGATGGGCATAC.

Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el exón 10:

F-5'GAAATCCTCAAAGTCATGCAGGAAG,
R-5'CCTCCAGTTGAGTAGCTGTTGAGCT.

El tiempo de extensión fue de 1 minuto a una temperatura de 94°C. El alineamiento de los oligonucleótidos se realizó a 60 °C por 30 segundos con tiempos de extensión de 2 minutos a 72 °C, durante 30 ciclos de amplificación.

El producto de PCR se observó en un gel de agarosa al 1.5% y se tomó fotografía del mismo (33).

IV.- ARSs. Determinación de actividad enzimática.

1.- ARS-A: Se analizó suero sanguíneo(2 ml) almacenado a -20 °C, utilizando p-NCS en buffer como sustrato. La actividad enzimática se midió por el aumento de p-NCS a

una densidad óptica de 545 nm, registrándose la actividad en nM/ mL de suero por 4 horas a 37 °C (34).

La actividad también se puede cuantificar de lisado de leucocitos por el método de dextrans. El botón de leucocitos se resuspende en solución de sacarosa 0.25 M, ocupando una décima parte del volumen original de sangre total del que se obtuvieron los leucocitos y la actividad se determinó utilizando como sustrato p-NCS. Los lisados se utilizaron para cuantificar la actividad enzimática con un dispositivo que extrae el exceso de proteínas a partir de la digestión final. La cantidad de proteínas se determinó con el método de Lowry (31, 34).

2.- ARS-B: Se realiza utilizando p-NCS, por inhibición de ARS-A, con la misma técnica de la empleada en ARS-A.

La diferencia entre las actividades de los dos tiempos (30' y 90') se tomó como la actividad de ARS-B por hora. La actividad de los primeros 30' incluye cierta actividad de la ARS-A, por lo que la inactivación de esta enzima es tiempo dependiente y se descartó para la valoración de la actividad de ARS-B (31).

V.- Oxido-reductasa de alcoholes grasos dependiente de NAD (FAO): Se estudió en colaboración con el Dr. William Rizzo, Departments of Pediatrics and Human Genetics, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

1.- Se realizó biopsia por "punch" de la piel afectada para llevar a cabo un cultivo de fibroblastos en el laboratorio de referencia. Una vez obtenidos los fibroblastos se recolectaron por tripsinización y fueron lavados 2 veces con PBS. Posteriormente fueron resuspendidos en Tris-HCl 25mM y sacarosa 0.25M a pH de 8, fueron homogeneizados, resuspendidos y separados por ultracentrifugación secuencialmente a 33,000 g y 120,000 g.

2.- El estudio enzimático de la FAO, como complejo enzimático, se realizó en homogenados de fibroblastos que contenían de 10-25 µg de proteína utilizando hexadecanol radioactivo como sustrato. El producto de la hidrólisis fue recuperado con hexano, agua e NaOH 0.3M en etanol. La fase superior contenía el hexadecanol radioactivo mientras que la inferior contenía los extractos de hexano incluyendo

hexadecanal, ácido hexadecanoico y hexadecanol. Estos extractos fueron incluidos en placas de cromatografía y teñidos con Rodamina G. Las manchas correspondientes a los lípidos se visualizaron bajo luz UV. Dichas manchas se recuperaron y los lípidos se cuantificaron por espectroscopía de centelleo.

3.- Se analizó sólo la primera etapa del complejo enzimático que implica a la enzima FALDH o deshidrogenasa de ácidos grasos, enzima que cataliza la conversión del aldehído graso al ácido graso. El producto de la reacción se valoró al medir fluorométricamente la producción de NADH dependiente de aldehídos grasos utilizando como sustrato hexadecanal radioactivo y la actividad se midió con centelleografía.

La segunda etapa correspondiente a la enzima FADH o deshidrogenasa de alcoholes grasos no se analizó ya que no se ha encontrado alterada en los pacientes con síndrome de Sjögren-Larsson (35-36).

ANALISIS ESTADISTICO

No necesaria para este tipo de estudio.

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Se realizó una carta de consentimiento para participar en el estudio, en donde se informó a los padres de los pacientes de los riesgos existentes en la toma de muestras necesarias para el estudio, de acuerdo al tratado de Helsinki. El riesgo de toma de muestra de sangre por venopunción se considera menor al mínimo y el de biopsia de piel afectada es bajo basándose en el tiempo de cicatrización y al peligro de infección poco probable en este tipo de casos, ya que se realiza en condiciones ideales de asepsia y antisepsia.

RESULTADOS

Los datos atípicos de DMS observados en estos pacientes fueron: atrofia olivopontocerebelar y un deterioro neurológico en “meseta”. Se observó ausencia de otros datos clínicos clásicos como hepato-esplenomegalia y mucopolisacariduria (cuadro comparativo).

Característica	Paciente II-2	Paciente II-3	DMS
Edad de inicio	5 años	2 años	1-5 años
Curso de la enfermedad	Progresivo tipo meseta	Progresivo tipo meseta	Progresivo
Retraso mental	+	+	+
Paresia espástica	+	+	+
Facies tosca	+	+	+
Opacidad corneal	-	-	+/-
Coroiditis	+	+	+
Tórax en tonel	+	+	+
Hepato-esplenomegalia	-	-	+
Ictiosis	+	+	+
Sensibilidad al dolor	-	+/-	-
Vejiga neurogénica	+	-	+
Mucopolisacariduria	-	-	+
EEG anormal	+	+	+
Atrofia olivopontocerebelosa	-	-	-
Quiste aracnoideo retrocerebeloso	-	+	+: 1 caso
Patrones anormales de mielinización	+/-	+/-	+/-

Tabla 2: Cuadro comparativo mostrando en tonos de grises más intensos para los datos no informados previamente y más claros para los ausentes en este caso familiar.

El tamiz metabólico en orina fue negativo para mucopolisacáridos.

Los estudios de actividad enzimática se muestran en las tablas siguientes

ARS A

PACIENTE	LEUCOCITO (pmol/mg proteína/min)	SUERO (nmol/ml/hora)
RJ	0.466	4.93
RW	0.255	7.70
Padre	0.756	42.92
Madre	1.079	17.97
Control	0.7-5.0	35-50

ARS B

PACIENTE	LEUCOCITO (nmol/mg proteína/hr)
RJ	0.61
RW	0.30
Padre	18.34
Madre	79.62
Control	115-226

ARS C

PACIENTE	LEUCOCITO (pmol/mg proteína/h)
RJ	0.30
RW	0.28
Padre	0.94
Madre	0.50
Control	0.84

FALDH/FAO

PACIENTE	FIBROBLASTOS (pmol/min/mg proteína)	FIBROBLASTOS (pmol/min/mg proteína)
RJ	8586	3700
RW	8406	3430
Sjögren-Larsson	654 +/- 412 (147-1600)	4420 +/- 810
Control	8540 +/- 1158	4350 +/- 440

Estudio molecular de STS

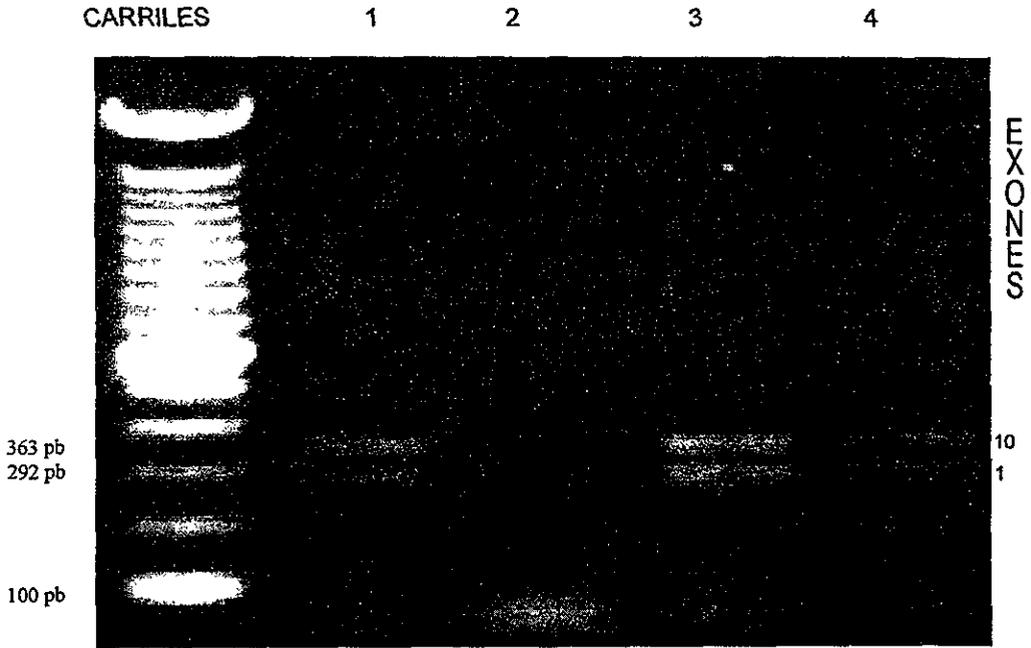


Figura 7: Control sano en el carril 1, paciente con ILX en el carril 2, paciente RJ en el carril 3 y paciente RW en el carril 4. En el margen derecho se señala el exón 1 con 292 pb y el exón 10 con 363 pb.

DISCUSION

Los pacientes fueron diagnosticados inicialmente con síndrome de Sjögren-Larsson, las características clínicas atípicas para este síndrome eran la coroiditis y el gran quiste retrocerebeloso, datos no informados para este padecimiento. Considerando que pudiera tratarse de una alteración desconocida del gen FALDH, se realizó cuantificación de la actividad enzimática en cultivo de fibroblastos, la cual fue normal descartándose este diagnóstico. Dentro de los datos clínicos también se encontraba el retraso en el desarrollo sexual secundario, dato clínico que podría corresponder a un síndrome de genes contiguos abarcando STS y KAL, por lo que se realizaron las pruebas de actividad de STS y la amplificación del gen por técnica de PCR, la actividad enzimática estuvo en límites de portadoras para los pacientes, para el padre normales y para la madre intermedios, es decir, entre portadoras y normales. El gen STS amplificó en todos los casos, por lo que se excluyó el síndrome de genes contiguos. Esto último nos inclinó a pensar que podría tratarse de una deficiencia múltiple de sulfatasas en donde pueden encontrarse defectos parciales de la actividad de ARS-C y deficiencia variable tejido específica en la actividad de otras sulfatasas. Al realizar los estudios de ARS-A y ARS-B encontramos que también había un defecto parcial de la actividad enzimática sin ser completamente anormales, más bien correspondían a los niveles observados en heterocigotos para las deficiencias aisladas.

Las características clínicas mencionadas en nuestros pacientes son compatibles con DMS. La mayoría de los datos corresponden a los reportados previamente para este padecimiento. Además, en esta familia se observa una genealogía compatible a una entidad autosómica recesiva lo que corresponde al patrón de herencia de la DMS. La DMS o sulfatidosis juvenil tipo Austin es una enfermedad autosómica recesiva cuyas manifestaciones clínicas incluyen datos tanto de LMC como de mucopolisacaridosis (8).

El deterioro neurológico en la DMS es típicamente progresivo. Cuando inicia tempranamente, los pacientes presentan un deterioro neurológico rápidamente progresivo (clase I) y cuando el inicio es tardío, la evolución es lenta (clase II) (9). En el caso de nuestros pacientes es difícil ubicar un tipo determinado dentro de la clasificación clínica, ya que el inicio es temprano y la evolución es en "meseta", es decir,

en la fase inicial es rápidamente progresiva y en la fase tardía lentamente progresiva. Su evolución inicial rápida correspondería a la clase I, mientras que la tardía a la clase II. Por otra parte, dentro de la clasificación bioquímica entrarían en el grupo II (10), lo que no concuerda con la edad de inicio ni el tipo de evolución. De este modo, nuestros pacientes no podrían corresponder a ninguna de estas clasificaciones.

Después de la segunda década, los pacientes sobrevivientes de DMS generalmente presentan serias alteraciones neurológicas que no les permiten deambular ni comunicarse con el medio exterior. En el caso del paciente RJ, a la edad de 22 años se inicia la dependencia para deambular sin mostrar mayor deterioro del lenguaje, sin embargo, en el hermano de 17 años de edad, que no presenta mayor deterioro en la deambulación, sí se presentan trastornos importantes del lenguaje. Estos datos son paradójicos ya que esperaríamos que las lesiones en cerebelo dieran como resultado inicialmente alteraciones graves de la marcha, lo que no se observa en el paciente RW, portador de un gran quiste retrocerebeloso. Estos defectos podrían tener relación con el defecto metabólico más que con los hallazgos neuroanatómicos observados.

Otros datos no reportados anteriormente y que observamos en nuestros pacientes son la atrofia olivopontocerebelosa y la atrofia tapetoretiniana. Ambas pueden ser producto de la acumulación del sustrato (s). La atrofia tapetoretiniana es un tipo de coroiditis compatible con las observadas en otros casos de DMS.

En relación a los datos clínicos de enfermedad de depósito, en nuestros pacientes se encontraron datos atípicos como son los pulgares y ortijos anchos sin disostosis franca. Además se observa ausencia de hepato-esplenomegalia y mucopolisacariduria, datos casi siempre constantes en los casos reportados. La mucopolisacariduria en DMS no es generalizada en estadios tempranos y la hepato-esplenomegalia se presenta una vez instalado el resto del cuadro clínico. Existe un caso reportado con deficiencia de DMS que no presentó mucopolisacariduria ni hepato-esplenomegalia con evolución progresiva del tipo de la clase I y no se explica la posible causa. En este caso se encontraron alteraciones enzimáticas sólo en leucocitos a pH ácido y no en fibroblastos de cosecha temprana, ni bajo otras condiciones (7). Estos estudios no informan otras características clínicas que pudieran correlacionarse con actividad de otras sulfatasas.

En otros casos no se ha demostrado mucopolisacariduria generalizada (sulfatos de dermatan, keratán y heparán) y la causa se ha correlacionado con las enzimas correspondientes afectadas en menor grado (37). Esto implica que a pesar de tener un mismo sitio de modificación cotraduccional/postraduccional, existen otros factores que modulan las condiciones de las modificaciones postraduccionales, explicándose así la expresividad variable.

Anteriormente se ha observado variabilidad clínica en DMS (38). Existe una "variante" saudí que incluye compresión de médula espinal a nivel cervical e hidrocefalia (38). Otras variantes son las de Tanaka con cambios fenotípicos moderados, de inicio tardío y deterioro neurológico lentamente progresivo y la de Vamos con inicio muy temprano (etapa neonatal) y deterioro neurológico rápidamente progresivo, mismas que corresponden a la contraparte de nuestros pacientes, además ninguno de los casos reportados menciona un deterioro neurológico tipo meseta así como los otros datos atípicos de nuestros pacientes ya comentados (39-40).

Gran cantidad de variables fisiológicas pueden afectar la actividad enzimática, desde la localización de los genes, expresión de genes contiguos, reacciones en cadena, cantidad de sustrato, etc. La actividad residual de las enzimas puede estar asociada a disminución en la afinidad al sustrato o a los cofactores. También puede ser resultado de la inestabilidad de la proteína o bien pueden estar sintetizándose pequeñas cantidades de las enzimas. En este caso en particular, independientemente de la modificación postraduccional requerida, deben considerarse los mecanismos de anclaje al RE probablemente afectados también por el factor modificador (3, 41).

Nuestros resultados nos indican que el defecto enzimático no incluye en el mismo grado a todas las sulfatasas, al menos a niveles perceptibles de expresión fenotípica. Es posible que la alteración sea tan leve en algunas de estas enzimas que los niveles de sulfatasas activas sean capaces de desempeñar una función umbral. Consideramos que estos pacientes pudieran ser una variante de DMS y finalmente de LMC con una mutación en el gen modificador de las sulfatasas que afecta en grado mínimo a enzimas como la iduronidasa, sulfatasa de sulfato de iduronato o la de N-acetilgalactosamina-6-sulfato, proteínas afectadas en los casos clásicos de DMS. Se requerirán estudios más detallados para probar esta hipótesis.

En el momento actual, no se ha logrado clonar el gen del factor modificador de las sulfatasas y por tanto se desconoce el tipo de mutación que presentan los casos estudiados. A nosotros nos interesa conocer el tipo de defecto molecular en este caso familiar para estudiar íntegramente el caso. Con estos datos podría realizarse una nueva clasificación con bases moleculares más que bioquímicas con valor pronóstico que permita correlacionar los cuadros clínicos, especialmente las variantes descritas.

Para el médico genetista, en ocasiones el diagnóstico clínico representa una difícil tarea ya que en muchas ocasiones no se cuenta con las herramientas para llevar a cabo las pruebas bioquímicas y moleculares correspondientes. Por tal motivo no resulta fácil concluir el diagnóstico.

En otras enfermedades genéticas los estudios moleculares han permitido una mejor comprensión de la expresión génica variable y de la interacción que tiene con otros factores que la modifican. Consideramos que este tipo de estudios aportarían datos más sólidos y permitirían evitar una serie de estudios invasivos, tales como la biopsia de nervios periféricos y toma de muestra de LCR que no proporcionan una certeza diagnóstica.

CONCLUSIONES:

- 1.- Los estudios bioquímicos son compatibles con DMS.
- 2.- Es el primer reporte de DMS en pacientes mexicanos.
- 3.-Nuestros pacientes presentaron coroiditis tapetoretiniana, atrofia olivopontocerebelosa y deterioro neurológico en meseta no reportados previamente.
- 4.- En este caso familiar no se detectó mucopolisacariduria ni hepatoesplenomegalia y las disostosis eran discretas.
- 5.- En este trabajo se informan nuevos datos clínicos no informados en la literatura.

Hoja de vaciamiento de datos.

Nombre del paciente: _____

apellido paterno apellido materno nombre(s)

Edad _____ Sexo _____

Dirección _____

Tel _____

Arbol genealógico

ESFERA NEUROLOGICA

Edad de inicio _____ IQ(inicio) _____ IQ (actual) _____

Edad mental _____ Edad real _____

Datos de sufrimiento fetal : _____

Hipogonadismo (tipo) : _____

Desarrollo psicomotor: _____

Manifestaciones iniciales: _____

Actividad física inicial _____ Actividad física actual _____

Estado actual: _____

EXPLORACIÓN FÍSICA:

Peso _____ Talla _____ Brazada _____ PC _____

PT _____ PA _____ SS _____ SI _____

Habitus exterioris: _____ Función motora

(Marcha normal, en talones y en ortejos, movilidad articular, movimientos involuntarios)

Función sensitiva _____:
Dolor _____ Temperatura _____ Estimulo luminoso _____ Posición _____ Vibraciones _____
Funciones corticales (consensual, grafestesia, estereognosia) _____
Reflejos osteotendinosos (biceps, tríceps, braquioradial, patelar y del tendón de Aquiles) _____ Babinsky _____
Prueba palmo-mental _____ Prueba dedo-nariz _____ Prueba cadera-rodilla-pie _____
fuerza de oposición a la flexión _____ Romberg _____
Presión frontal _____
Status mental: Nivel de conciencia _____ Memoria reciente _____
Memoria tardía _____
Lenguaje (repetición, lectura, nombre) _____.

Cabeza: fenotipo craneal _____ implantación del cabello _____ textura del cabello _____

Cara: Tosca _____ sinofris _____ distiquiasis _____ nistagmus _____ estrabismo _____ labios gruesos _____ boca abierta _____ fondo de ojo _____ alteraciones acneiformes _____

Alteraciones esqueléticas: Tórax (tonel, en quilla, carinatum o excavatum) _____
Extremidades: (*Genu varu, genu valgo, genu recurvatum,* ortijos anchos, hallux valgus, pie cavo, pie equino, etc) _____ (pies) _____ (manos) _____

Columna vertebral (escoliosis, xifosis, lordosis) _____

Genitales :

Femenino: (Labios mayores, labios menores) _____

Vello pubiano (Tanner) _____ Desarrollo mamario (Tanner) _____

Masculino: Criptorquidia _____

Vello pubiano (implantación) _____ Tanner _____

Caracteres sexuales secundarios (Hipospadias, micropene): _____

Piel (presencia de lesiones, distribución):

Ictiosis _____ eritrodermia _____ acné _____

Otros datos: _____

Prueba oftalmológica: Estrabismo, nistagmo, reflejos consensuales, etc. Fondo de ojo:
(mácula, papila, edema, sangrado) _____

ESTUDIOS DE GABINETE

Rastreo radiológico de disostosis: _____

Datos de condrodisplasia punctata _____

Alteraciones falángicas _____

Neoformaciones óseas _____

Osteoporosis _____

EEG: _____

EMG: _____

RMN: _____

Estudio audiométrico tonal y/o potenciales auditivos _____

ANALISIS CLINICOS Y BIOQUIMICOS CLINICOS

Mucopolisacariduria: _____

STS _____

FALDH _____

FAO _____

ARS-A _____ ARS-B _____

ESTUDIOS MOLECULARES :

Amplificación del gen STS _____

Carta de consentimiento

México, D.F. a _____ de _____ de _____.

Yo, _____, estoy informado de las pruebas que se realizarán a mis hijos: _____ y _____ con la finalidad de determinar el diagnóstico de la enfermedad que padecen y estoy ampliamente enterado de los riesgos y beneficios que el estudio conlleva.

La toma de muestras consistirá en una biopsia de piel, que será extraída de una región afectada por ictiosis y toma de 15-20 ml de sangre periférica (riesgo menor al mínimo), lo cual podría originar molestias mínimas en mis hijos.

Acepto que participen en el estudio en el entendido que me será informado el resultado de los estudios por escrito así como un asesoramiento genético como conclusión del mismo. La información será estrictamente confidencial y las muestras no serán utilizadas para otros fines.

Reitero, además que en el momento en que yo lo decida, podré retirar a mis hijos del protocolo de estudio no afectando mi decisión a la calidad de atención médica hacia ellos.

Padre:

Madre:

Testigo (s)

Médico responsable

REFERENCIAS

- 1.- Mc Kusick VA. Mendelian inheritance in man. A catalogue of human genes and genetic disorders. The John Hopkins University Press, 1994.
- 2.- Koone M D, Rizzo W B, Elias PM, Williams ML, Lightner V, Pinnel SR. Ichthyosis, mental retardation and asymptomatic spasticity. Arch Dermatol 1990; 126:1485-1490.
- 3.- Scriver Ch, Beaudet A L, Sly W S, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Ed. Mc Graw Hill, 1995. pp 81, 2702-2710, 2711-12, 2693-2739.
- 4.- Schmidt B, Seimer T, Ingendoh A, Von figura. A novel aminoacid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. Cell 19965; 82:271-8.
- 5.- Nelson K, Bielicki J, Anson DS. Inmortalization and characterization of a cell line exhibiting a severe multiple sulfatase deficiency phenotype. Biochem J 1997; 15(326 pt 1): 125-130.
- 6.- Parenti G, Meroni G, Ballabio A. The sulfatase gene family. Curr Opin Gen Develop 1997; 7: 386-391.
- 7.- Soong BW, Casamassima AC, Fink JK, Constantopouos G, Horwitz AL. Multiple sulfatase deficiency. Neurology 1988; 38(8): 1273-5.
- 8.- Kihara H. Genetic Heterogeneity in metachromatic leukodystrophy. Am J Hum Genet 1982; 34:171-181.

- 9.- Eto Y, Gomibuchi Y, Umezawa F, Tsuda T. Patochemistry, pathogenesis and enzyme replacement in multiple sulfatase deficiency. *Enzyme* 1987; 38(1-4): 273-9.
- 10.- Steckeel F, Hasilik A, vom Figura K. Synthesis and stability of arylsulfatase A and B in fibroblast from multiple sulfatase deficiency. *Eur J Biochem* 1985; 151(1): 141-5.
- 11.- Chang PL, Rosa NE, Ballantine SR, Davidson RG. Biochemical variability of arylsulfatase -A, -B and -C in cultured fibroblasts from patients with multiple sulphatase deficiency. *J Inherited Metab Dis* 1983; 6(4): 167-72.
- 12.- Meroni G, Franco B, Archidiacono N. Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggest gene duplications in an ancestral pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 1996; 5(4):423-31.
- 13.- Gieselmann V, Zlotgora S, Harris A, Wenger DA, Morris CP. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum mut* 1994; 4: 233-242.
- 14.- Alvarez Leal M, Castillo Solís T, Pérez Zuno JA, et al. Activity of arylsulfatase A enzyme in patients with schizophrenia disorders. *Rev Invest Clin* 1995; 47(5): 387-92.
- 15.- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of aminoacids identity with arylsulfatases A y C. *Genomics* 1990; 6: 149-158.
- 16.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Taggart 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.

- 17.- Stein C, Hille A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosilation and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem* 1989; 264 (23): 13865-72.
- 18.- Franco B, Meroni G, Parenti G, Levilliers J, Bernard L, Gebbia M, Cox L . A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for Warfarin embryopathy 1995; 81: 15-25.
- 19.- Daniele A, Parenti G, d'Addio M, Andria G, Ballabio A, Meroni G. Biochemical characterization of arylsulfatase E and functional analysis of mutations found in patients with chondrodysplasia punctata. *Am J Human Genet* 1998; 62(3):562-72.
- 20.- von Figura K, Schmidt B, Selmer T, Dierks T. A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases. Its role in catalysis and disease. *Bioessays* 1998; 20 (6): 505-10).
- 21.- Dierks,T, et al. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(22):11963-11968.
- 22.- Dierks T, Lecca MR; Schmidt B; von Figura K. Conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *FEBS-Lett* 1998; 423(1): 61-5.
- 23.- Recksiek M, Selmer T, Dierks T, Schmidt B, von Figura K. Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme immediate by substituting the active site formylglycine. *J Biol Chem* 1998; 273 (11): 6096-6103 .

- 24.- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 1997; 5:277-289.
- 25.- Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saenger W. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 1998; 37 (11): 3654-64.
- 26.- Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS, von Figura K. Cloning and expression of human arylsulfatases. *J Biol Chem* 1989; 264:1252
- 27.- Modaressi S, Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993; 374 (5): 327-35..
- 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 Mol Genet* 1996; 22(2): 105-117.
- 29.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Taggart 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: 443-54.
- 30.- Puca AA, Zollo M, Repetto M. Identification by shotgun sequencing, genomic organization and functional analysis of a fourth arylsulfatase gene (ARSF) from the Xp22.3 region. *Genomics* 1997; 42: 192-9.
- 31.- Thomas GH y Howell RR. Selected screening tests for genetic diseases. Chicago Year Book Medical Publishers ; 1973:36-42.

- 32.- Cuevas-Covarrubias S A, Juárez-Oropeza M A, Miranda-Zamora R. El ensayo enzimático de la sulfatasa esteroidea en la ictiosis ligada al X. Rev Fac Med UNAM, 1992; 35 (1): 3-7.
- 33.- Cuevas-Covarrubias S A. X-linked ichthyosis in Mexico: High frequency of deletions in the steroid sulfatase encoding gene. Am J Med Genet 1997; 72:415-416.
- 34.- Beratis NG, Aron AM, Hirschhorn K. Metachromatic leukodystrophy: Detection in serum. J Pediatr 1973; 83(5): 824-7.
- 35.- Rizzo W, Damman AL, Craft DA. Sjögren-Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol:nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. J Clin Invest 1988; 81: 738-44.
- 36.- Rizzo W, Craft DA. Sjögren-Larsson syndrome. Deficient activity of the fatty aldehyde deshydrogenase component of fatty alcohol:NAD⁺ oxidoreductase in cultured fibroblast. J Clin Invest 1991; 88: 643-48.
- 37.- Minami R, Fujibayashi S, Tachi N, Wayatsuma K, Nakao T, Ikeno T, Tugawa S, Orii T. Activities of sulfatasas for the degradation of acidic glycosaminglycans in cultured skin fibroblasts from two siblings with multiple sulfatase deficiency. Clin Chim Acta 1983; 129(32): 175-80.
- 38.- al Aqeel A et al. Saudi variant of multiple sulfatase deficiency. J Child Neurol 1992; 7 Suppl: S12-S21.
- 39.- Tanaka A, Hirabayashi M, Ishii M, Yamaoka S, Kamura Y, Nishida M, Issiki G. Complementation studies with clinical and biochemical characterization of a new variant of multiple sulphatase deficiency. J Inherited Metab Dis 1987; 10(2): 103-

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

110.

- 40.- Vamos E, Liebaers Y, Bousard N, Libert J, Perlmutter N. Multiple sulphatase deficiency with early onset. *J Inherit Metab Dis* 1981; 4(2):103-4.
- 41.- Schierau A, Dietz F, Lange H, Schestag F, Parastar A, Gieselmann V. Interaction of arylsulfatase A with UDP-N-Acetylglucosamine: Lysosomal enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 1999; 274(6): 3651-58.