

“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA FILAGRINA, COMO
GEN MODIFICADOR DE LA ICTIOSIS LIGADA AL X”

PRESENTA:

ELVIA CRISTINA MENDOZA CAAMAL

ASESORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADORES:

M. EN C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA, HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO.

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá por su confianza, sus sabios consejos, su apoyo incondicional y por ser un ejemplo a seguir.

A mi papá por impulsarme a ser mejor cada día y enseñarme que no hay barreras para alcanzar mis metas.

A mi hermana Adelaida por su compañía, por escucharme y darme buenos consejos cuando lo he necesitado.

A mi hermanita Shunashi por enseñarme a ver la vida de otra manera y compartir sus puntos de vista conmigo.

A mi hermano Ignacio por su cariño y por hacerme pasar muchos ratos de felicidad.

A Edgar Cortés por los maravillosos días que hemos compartido, por reír y llorar a mi lado. Porque para mi, ha sido muy importante contar con tu apoyo.

A mis, no solo compañeros sino grandes amigos Mony Ávila, Karem Nieto, Dulce Castro, Miguel Del Moral, Jaime López y Cuauhtli Azotla, por hacerme más llevadera mi estancia en este hospital y enseñarme el valor de la honestidad y la amistad.

A todos los que conforman el servicio de genética del Hospital General de México por el apoyo para la realización de este trabajo y por sus enseñanzas.

A los pacientes porque sin ellos, mi vida profesional no tendría sentido.

ÍNDICE

I. RESUMEN	5
II. ANTECEDENTES HISTORICOS	7
III. MARCO TEORICO	8
1. La piel	8
2. Epidemiología	10
3. Ictiosis Ligada al X	11
4. La enzima sulfatasa de esteroides	14
5. Ictiosis Vulgar	17
6. Gen <i>FLG</i> y la proteína filagrina	17
7. Relación de la Filagrina con la Ictiosis ligada al X	22
IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
V. OBJETIVO	23
VI. HIPÓTESIS	23
VII. DISEÑO DEL ESTUDIO	24
VIII.MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Poblaciones incluidas en el estudio	26
2. Caracterización clínica de la gravedad de la ILX	26
3. Estudio molecular	28
IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	34
X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
XI. RESULTADOS	35
XII. DISCUSIÓN	37
XIII.CONCLUSIÓN	41
XIV.REFERENCIAS	42

I. RESUMEN

Los dos trastornos de queratinización más frecuentemente encontrados en la clínica de genodermatosis son la ictiosis ligada al X (ILX) y la ictiosis vulgar (IV). La delección completa del gen *STS*, localizado en el cromosoma X, es la principal causa de ILX, aunque en menor frecuencia se han reportado mutaciones puntuales. Recientemente se han descrito mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para la filagrina (*FLG*) como causales de la IV, la cual se hereda con un patrón de herencia semidominante donde los heterocigotos pueden tener una presentación clínica leve comparada con los homocigotos que presentan un cuadro clínico más importante. Dos mutaciones que provocan la pérdida de expresión de filagrina (R501X y 2282del4) son las más prevalentes en población Europea, en población asiática se han reportado otras mutaciones que son más infrecuentes.

Todos los pacientes con ILX presentan actividad nula de la enzima sulfatasa de esteroides, por lo que no existe una relación entre esta y la variabilidad de la gravedad, de este modo se ha propuesto que deben existir mutaciones en otros genes que contribuyan a los diferentes tipos de gravedad en pacientes con ILX. Recientemente se ha descrito que mutaciones en el gen de la filagrina pueden contribuir a un cuadro clínico más grave.

En este estudio buscamos la mutación R501X en el gen *FLG* en pacientes con diagnóstico molecular de ILX y tratamos de establecer las consecuencias fenotípicas de la interacción génica entre mutaciones en los genes *STS* y *FLG*.

Se analizaron 12 pacientes y 2 controles mediante amplificación por PCR de una región de 360pb del gen *FLG* y posteriormente se secuenciaron para la identificación de la mutación R501X. En ninguno de nuestros pacientes se encontró esta mutación, sin embargo los pacientes presentan diferente grado de gravedad, concluimos que esta mutación en el gen *FLG* no es la causa de que nuestros pacientes tengan un cuadro clínico más grave, sin embargo no se descarta que haya otras mutaciones en el gen *FLG* que no fueron estudiadas en este trabajo o en otros genes que participan en la cornificación de la piel que puedan contribuir a la gravedad en nuestros pacientes.

II. ANTECEDENTES HISTORICOS

El término ictiosis describe a una amplia variedad de entidades caracterizadas por alteraciones en la queratinización de la piel y ha sido utilizado por más de 2000 años. Proviene de la raíz griega "ichthys" que significa pez, nombre asignado por la similitud de las escamas del pescado con la apariencia de la piel de los pacientes con esta entidad.

Lorry en 1777 fue uno de los primeros que describió la ictiosis en la literatura, en el paciente Edward Lambert, en 1808 Willan refirió otros casos similares.

En 1813 Thomas Bateman designó por primera ocasión a la ictiosis, como enfermedad de piel de pescado. En 1884, Fox reportó a "el niño cocodrilo", relacionando este trastorno como consecuencia de un ataque de cocodrilo sufrido por la madre durante el embarazo. (1)

Cockayne (2) fue el primero en reportar un tipo de ictiosis que solo afectaba a varones. La Ictiosis Ligada al X (ILX) fue reconocida como una entidad diferente del resto de las ictiosis por Wells y Kerr en 1965(3). En el mismo año France y Liggins observaron la ausencia de la enzima sulfatasa de esteroides (SE) en la placenta de algunos fetos masculinos (4), en 1976, Jobsis y colaboradores sugirieron que esta deficiencia podría estar relacionada con la ILX.(5) En 1978, Koppe(6) y Shapiro(7) identificaron la deficiencia de la enzima SE en fibroblastos de pacientes con ILX. Posterior a otros reportes, se confirma que esta deficiencia se encuentra ampliamente distribuida e involucra al estrato córneo de la epidermis. Fue en 1980 cuando, de acuerdo a los

hallazgos anteriores, numerosos laboratorios se dedicaron a clonar el gen de la sulfatasa de esteroides.

III. MARCO TEORICO

La ictiosis comprende a un grupo de trastornos de la piel de distintas etiologías que se caracterizan por la presencia de escamas. Se han identificado más de 25 genes que codifican para diversas proteínas de la epidermis, las cuales incluyen enzimas del metabolismo de los lípidos, proteasas y sus inhibidores, proteínas estructurales epidérmicas, proteínas involucradas en la comunicación celular, señalización y transcripción de genes. Alteraciones en cualquiera de estos componentes, resultan en una respuesta epidérmica atípica, con hiperplasia y formación de un exceso de estrato corneo, acompañado de descamación anormal, con visible acumulación de escamas en la superficie de la piel, la cual es el dato clínico característico de las Ictiosis.(8)

Seis principales subtipos clínicos de la ictiosis hereditaria no sindrómica son reconocidos, y van de la forma más severa: Ictiosis Arlequín (IA); Ictiosis Lamelar (IL); Eritrodermia Ictiosiforme Congénita No Bulosa (EICNB); Eritrodermia Ictiosiforme Congénita Bulosa (EICB); Ictiosis Ligada al X (ILX) a la forma más leve que corresponde a la Ictiosis Vulgar (IV).(8)

1. LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, el cual tiene un peso en adultos de aproximadamente 4kg, y cubre un área de alrededor de 2m². Tiene muchas funciones importantes, que van desde lo vital hasta lo cosmético. Una de ellas es proteger al

cuerpo contra el daño externo de factores químicos, físicos y biológicos. Otras funciones son prevenir la pérdida de agua, asistir a la regulación de temperatura y preservar el entorno interno.(9)

La piel normal está constituida por 3 capas que de la superficie a la profundidad son: la epidermis, la dermis y la hipodermis. (Fig.1)

La epidermis es la capa más superficial de la piel, es un epitelio plano poliestratificado queratinizado con cuatro capas. El orden de los estratos desde la superficie hacia el interior es el siguiente: 1) estrato córneo, 2) estrato granuloso, 3) estrato espinoso y 4) estrato basal.

La epidermis está constituida aproximadamente en un 90% por las células epidérmicas (queratinocitos), pero además contiene células de Langerhans (sistema inmune), melanocitos (sistema pigmentario) y células de Merkel (sistema nervioso).(10)

A nivel funcional se pueden distinguir tres regiones en la epidermis que se renuevan desde la base de modo permanente:

1. Zona proliferativa (estrato basal): renovación celular, denominada epidermopoyesis.
2. Zona de diferenciación (estrato espinoso y granuloso): diferenciación y maduración celular.
3. Zona funcional (capa córnea): capa protectora y de eliminación celular.

La dermis está situada por debajo de la epidermis y está conforma por tejido conectivo, sustancia fundamental y células. El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares.

La hipodermis, llamada también panículo adiposo o tejido celular subcutáneo, está constituida por adipocitos, los cuales se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares. (10)

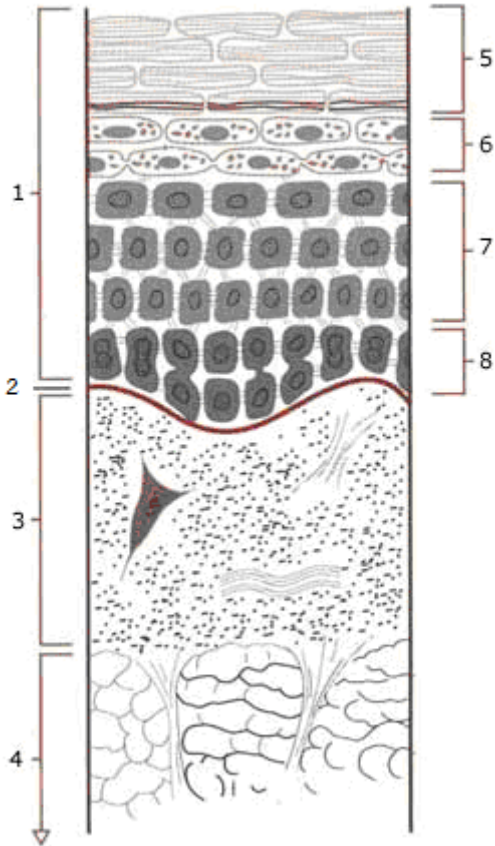


Fig. 1 La piel. 1. Epidermis, 2. Membrana basal, 3. Dermis, 4. Tejido celular subcutáneo o hipodermis, 5. Estrato Córneo, 6. Estrato granuloso, 7. Estrato espinoso, 8. Estrato basal

2. EPIDEMIOLOGÍA

La Ictiosis Vulgar (IV) y la Ligada al cromosoma X (ILX) son los dos tipos de ictiosis más frecuentes.

Estadísticas recientes refieren que la ILX afecta aproximadamente a 1 de cada 2000-6000 varones, sin una diferencia racial ni geográfica significativa.(14,15) Mientras que la IV tiene una frecuencia de 1 en 250 nacidos vivos. (41)

Las características principales de estos dos tipos de ictiosis se refieren en el cuadro 1.

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ICTIOSIS LIGADA AL X Y LA ICTIOSIS VULGAR

Tipo de Ictiosis	Tipo de herencia	Incidencia	Edad de aparición	Escama	Distribución	Características asociadas
IV	AD	1:250	3- 12 meses	Fina Clara Adherente	Región extensora de extremidades Hiperlinealidad de palmas y plantas	Queratosis Pilar Atopia Asma
ILX	RLX	1:2000-6000	0-3 meses	Grande Oscura Adherente	Region flexora y extensora de miembros	Opacidad Corneal Criptorquidismo

IV: Ictiosis Vulgar ILX: Ictiosis Ligada al X AD: Autosómico Dominante RLX: Recesivo Ligado al X

3. ICTIOSIS LIGADA AL X

La ictiosis ligada al X (ILX) es una genodermatosis relativamente común que se transmite con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Por lo que, solo los varones manifiestan la enfermedad, mientras que las mujeres son portadoras y no tienen manifestaciones clínicas.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

MANIFESTACIONES CUTÁNEAS.

La ILX se caracteriza por la presencia de escamas café oscuro, de forma poligonal, en diferentes partes de la superficie del cuerpo. Las lesiones generalmente se distribuyen simétricamente y son en general más evidentes en las zonas extensoras de los miembros, particularmente en los miembros pélvicos.(11) El tamaño de la escama es variable pero de mayor tamaño en regiones extensoras de los miembros pélvicos que en la parte superior del tronco. La cara casi nunca presenta escamas, con excepción del área retroauricular, lo cual para algunos autores ha llegado a ser considerado un dato patognomónico de esta entidad.(12) En algunas ocasiones las zonas flexoras pueden estar afectadas así como el cuello y piel cabelluda.(13)

Las palmas y las plantas de los pies no suelen estar afectadas.(14) Las uñas y cabello son normales. (15)

A diferencia de la IV, que es su principal diagnóstico diferencial, la ILX aparece a edades muy tempranas, la mayoría inicia antes de los 3 meses de edad.

La ILX inicia con una descamación generalizada con escama grande, levemente adherente, de color claro que son substituidas durante las semanas siguientes por escamas oscuras, poligonales y fuertemente adherentes a la superficie de la piel.

Durante la infancia temprana, el cuero cabelludo está casi siempre afectado, así como las áreas retroauriculares y las regiones laterales y posteriores del cuello. Las escamas de color marrón le dan al paciente un aspecto "sucio".

Con el tiempo, las lesiones en la cabeza desaparecen casi totalmente, mientras que, en el tronco y las superficies extensoras de los miembros pélvicos, llegan a ser más prominentes.

Aunque la enfermedad persiste durante toda la vida del paciente, la descamación mejora durante el verano y puede empeorar durante el tiempo seco y frío. (16)

MANIFESTACIONES EXTRACUTANEAS

Alteraciones oculares: La opacidad corneal es la característica oftalmológica más común en estos pacientes, y se estima que entre el 10 y 15% de los varones afectados y mujeres portadoras tienen depósitos corneales difusos en la cápsula posterior de la membrana de Descemet.(17,18) Aunque esta lesión puede aparecer a cualquier edad(17), lo más frecuente es que aparezca entre la segunda y tercera década de la vida.(19,20) Sin embargo, no afecta la agudeza visual. Además algunos pacientes han presentado embriotoxón posterior (20) y deuteranopía.(21)

Alteraciones gonadales: La incidencia de criptorquidia, en los pacientes con ILX, es más alta que la esperada para la población general,(22,23) se presenta en el 7% de los pacientes, sugiriendo que esta anomalía podría ser debida a la deficiencia de SE o quizás a alteraciones en genes contiguos al gen *STS* en el cromosoma X.(24) También se ha asociado a cáncer testicular(25) e hipogonadismo sin criptorquidia, aunque el papel exacto de la SE en la diferenciación testicular no ha sido dilucidada.

Alteraciones del sistema nervioso central: Se han encontrado algunas alteraciones en el electroencefalograma de los pacientes, sin embargo estas son atribuidas a un trabajo de parto prolongado, característico de estos pacientes. Además se ha reportado crisis convulsivas (19) y trastornos psicológicos reactivos.(20)

Otras alteraciones que se han reportado en estos pacientes son hipertrofia de pílora,(26,27) leucemia linfoblástica (28) y defectos de la pared abdominal.(29)

Se han encontrado algunos pacientes con grandes deleciones, las cuales involucran genes contiguos al *STS*, estos pacientes pueden presentar retraso mental, síndrome de Kallman por deleción del gen *KAL1*, el cual comprende hipogonadismo hipogonatrópico y anosmia, o características de condrodisplasia punctata por *CPDX1*, talla baja por *SHOX* y albinismo ocular por *OA1*, además de la ILX. (30)

4. LA ENZIMA SULFATASA DE ESTEROIDES.

La enzima sulfatasa de esteroides (SE) o arilsulfatasa C es una enzima de distribución ubicua. (31)

Es codificada por el gen *STS*, localizado en el cromosoma Xp22.3, cerca de la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones, dos regiones que no se transcriben, una en el extremo 5' de por lo menos 206 pares de bases (pb) y otra en el extremo 3' de 668 pb. Además presenta una señal de poliadenilación, de 13 pb antes del comienzo de la cola de poli-A. Tiene una región de aproximadamente 1.3 kb en el extremo 5' que contiene varios sitios de unión para factores de transcripción, entre estos se encuentran tres elementos potenciadores y un elemento represor. (31)

El gen *STS* tiene un pseudogen en los brazos largos del cromosoma Y (Yq11.2), con una homología del 90%. Existen familias de secuencias repetidas en bajo número de copias, intercaladas y distribuidas en la región Xp22.3 y hacia ambos lados del gen *STS*, que condicionan una recombinación anormal durante la meiosis por apareamiento entre

unidades de repetición, lo cual explica la alta frecuencia de las deleciones intersticiales en esta región génica. Aproximadamente el 90% de los pacientes tienen deleción completa del gen.

La enzima SE está compuesta por 583 aminoácidos, tiene un peso molecular de 63 kD y una vida media de 4 días. La enzima tiene modificaciones postraduccionales, una de ellos es la escisión de un péptido guía de 22 aminoácidos hidrofóbicos para finalmente dar origen a la SE madura de 61 kD.

Esta enzima cataliza la separación del grupo sulfato de los 3-beta-hidroxiesteroides sulfatados (sulfato de colesterol, estrona, testosterona, pregnenolona y dihidroepiandrosterona). Estos esteroides son inactivos cuando están sulfatados y tienen una vida media más larga.

La SE se localiza en el retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y membrana plasmática.

Existen 2 isoformas diferentes de la enzima SE, las cuales fueron clasificadas por su movilidad electroforética. La isoforma "s" (slow-migrating) o lenta, la cual es la que corresponde a SE y la "f" (fast migrating). La forma "s" es muy abundante en placenta, corazón, músculo esquelético, tiroides y glándulas suprarrenales mientras que la forma "f" se encuentra en hígado, páncreas, riñón. (32)

La placenta es un tejido rico en SE de origen embrionario, y es la responsable de la desconjugación de DHEAS, producida tanto por las glándulas suprarrenales de la madre como del feto, como paso anterior a la síntesis de estrógenos. (4, 33). En presencia de

un crecimiento y desarrollo normal, la DHEAS cruza la placenta, es desconjugada por SE, y convertida de estrona a estradiol a través de una serie de reacciones enzimáticas. Seguido de esto, parte de estos 2 componentes regresa a los tejidos fetales y es convertido a estriol, el cual en términos cuantitativos es más importante que el estrógeno durante el embarazo.

En los embarazos deficientes de SE, el bloqueo produce disminución de estrógenos, el cual es el producto final de la reacción. La mayoría de los embarazos de productos masculinos con deficiencia de SE, desarrollan falta en la progresión del trabajo de parto, debido a una insuficiente dilatación del cérvix, con relativa falla en la respuesta a oxitocina intravenosa. Ambos eventos son indicaciones de cesárea para resolución del embarazo, debido a que estos incrementan la morbi-mortalidad perinatal en pacientes afectados con ILX.

La piel tiene como principal componente a los lípidos, el sulfato de colesterol constituyen el 5% del total de los lípidos de la capa granular y un poco menos del estrato corneo y en la zona baja de la epidermis.

El sulfato de colesterol es encontrado en grandes cantidades en la zona baja del estrato corneo y en menor proporción con las capas superficiales y por lo tanto se cree que existe una relación entre el gradiente de sulfato de colesterol del estrato corneo y la descamación cutánea normal.

En pacientes con ILX se encuentra una concentración de sulfato de colesterol 10 veces mayor que en los pacientes con adecuada función de la enzima SE además las concentraciones de colesterol están disminuidas en un 50%.

Al parecer una alta concentración de sulfato de colesterol puede alterar las propiedades físicas de la membrana celular del estrato corneo, disminuyendo la cohesión intracelular.

Además el sulfato de colesterol inhibe la síntesis de colesterol, tanto en fibroblastos normales como en fibroblastos de los pacientes con ILX, lo que explica porque esta disminuido en estos pacientes.

Como el estrato corneo es un sitio activo de producción de colesterol, el sulfato de colesterol de la capa baja del estrato corneo, podría ser capaz de regular la esteroidogénesis de estratos adyacentes a través de un mecanismo de regulación negativa. Por lo tanto, a través del sulfato de colesterol, la SE controla indirectamente la producción de esteroides en la capa granular de la epidermis. (34)

5. ICTIOSIS VULGAR

CARACTERISTICAS CLÍNICAS

La IV se caracteriza por presentar escama fina que se encuentra predominantemente en brazos, piernas y abdomen inferior, hiperlinealidad palmar y queratosis pilar.

La afección a la piel comienza por lo general entre los 3 a 6 meses de edad. Las lesiones raramente se observan en las axilas o foseta cubital o poplítea.

El asma, eczema y fiebre de heno se han encontrado como características asociadas.

6. GEN *FLG* Y PROTEÍNA FILAGRINA

Recientemente se han descrito mutaciones en el gen *FLG* como causa de Ictiosis Vulgar. Las dos principales mutaciones en el gen *FLG* son R501X y 2282del4, ambas mutaciones se localizan en el exón 3 y conllevan a pérdida de expresión de la filagrina. (39,40)

Estas mutaciones tienen un patrón de herencia semidominante, lo cual significa que los individuos heterocigotos presentan un fenotipo leve, mientras que los que son homocigotos o heterocigotos compuestos, muestran un fenotipo grave.(41)

La filagrina es sintetizada como profilagrina y es codificada por el gen *FLG*, el cual se localiza dentro del complejo de diferenciación epidermal en el cromosoma 1q21(35), está conformado por 3 exones y dos intrones. El exón 1 tiene 15pb y contiene a la región 5' no traducida, el exón 2 tiene 159pb y contiene el codón de inicio, el exón 3 generalmente es largo con 12,753pb y codifica para el dominio N-terminal y todos los repetidos de filagrina. (36)

La profilagrina humana pesa aproximadamente 400 kDa, es rica en histidina y contiene entre 10-12 repetidos en tándem de filagrina, los cuales están flanqueados por dos repetidos parciales de filagrina y un dominio N y C-terminal.(37)

La región que codifica directamente a la proteína filagrina carece de intrones y cada molécula de filagrina está separada por un pequeño péptido de unión (36), que es

degradado proteolíticamente durante la conversión de profilagrina a monómeros activos de filagrina.

El dominio N-terminal de la profilagrina contiene 293 aminoácidos de longitud y puede ser subdividido en dos subdominios: un dominio A de 81 aa, que está altamente conservado en humanos y ratones, y un dominio B de 212 aa que está menos conservado.

El dominio A contiene dos motivos de unión a calcio, lo que sugiere que el calcio es un regulador clave en el procesamiento de la profilagrina durante la diferenciación terminal de la epidermis.

In vitro diferentes concentraciones de calcio promueven cambios conformacionales, que pueden exponer los sitios de escisión de la profilagrina para ser procesada a filagrina.

El dominio B contiene una señal de localización nuclear bipartita que facilita la translocación del dominio N-terminal a el núcleo en la diferenciación terminal del queratinocito. Esto sugiere que el dominio N-terminal juega un papel en la denucleación del queratinocito, como apoptótico nuclear en la transición de la célula granular a la célula cornificada anuclear.

El dominio C-terminal de la profilagrina comprende 157 aa, la función precisa de este dominio no es clara pero parece que su expresión es necesaria para el procesamiento de la profilagrina en filagrina, debido a que mutaciones que provocan una proteína truncada que permiten la expresión de 10 repetidos de filagrina pero no de la región C-terminal son incapaces de procesarse en monómeros de filagrina.

FOSFORILACIÓN DE LA PROFILAGRINA.

La profilagrina sufre fosforilación después de su síntesis y esto ocurre para prevenir su agregación prematura a los filamentos de queratina, debido a que sólo los monómeros de filagrina desfosforilados tienen la propiedad de agregación a los filamentos de queratina. Además la profilagrina fosforilada es insoluble lo que favorece su empaquetamiento en los gránulos de queratohialina.(43)

La fosforilación de la profilagrina provoca también cambios conformacionales que hacen inaccesibles los sitios de unión entre filagrinas evitando que puedan ser degradadas por proteasas.

PROCESAMIENTO POS-TRADUCCIONAL DE LA PROFILAGRINA A FILAGRINA

La conversión proteolítica de profilagrina en múltiples copias de filagrina durante la transición de la célula granular a una célula cornificada es un proceso altamente controlado que involucra la desfosforilación por una o más fosfatasa y proteólisis sitio específico.

La desfosforilación de la profilagrina ocurre como resultado de la inducción de proteínas con actividad de fosfatasa. La enzima tipo PP2A se ha purificado de la profilagrina y muestra un inusual sensibilidad al cloruro sódico cuya concentración disminuye durante la transición de la célula granular a cornificada.(43)

ESCISIÓN DE LAS REGIONES DE UNIÓN ENTRE FILAGRINAS

Durante el procesamiento de la profilagrina, el dominio N-terminal y C-terminal son removidos de la molécula de profilagrina madre, el dominio N-terminal sufre una

translocación nuclear y es degradada en dominio A y B. Estudios en ratones knockout han demostrado que varias proteasas están implicadas en este proceso sin embargo su función aún no es clara.

PROCESAMIENTO DE LA FILAGRINA

Después del procesamiento proteolítico de la profilagrina, los monómeros de filagrina resultantes son procesados en aminoácidos libres y sus derivados, Durante los estadios finales de diferenciación epidermal varias proteínas sufren deiminación [conversión postraduccional de residuos de arginina a residuos de citrulina, catalizado por deiminasa peptidil-arginina (PAD)]. Las isoformas de PAD 1 y 3, parecen estar involucradas en la deiminación de la filagrina, esta deiminación dentro del estrato corneo cambia la carga neta de la filagrina de básica a neutra, provocando alteración de las interacciones iónicas entre la filagrina y queratina.

El desdoblamiento de la filagrina por las PADs, la hace susceptible a proteólisis y promueve su degradación a aminoácidos libres. Recientemente se ha demostrado que la proteasa caspasa-14 participa en este proceso o puede actuar vía la activación de endo y exopeptidasas. La calpaína 1 y la hidrolasa de bleomicina también participan en este proceso y sus productos forman parte del factor de humectación natural.

El procesamiento de la filagrina a aminoácidos higroscópicos libres y sus derivados, tales como ácido carboxílico pirrolidona que es el principal contribuyente del factor de humectación natural, es el responsable del mantenimiento de la hidratación de la piel y retención de agua dentro del estrato córneo. El ácido trans-urocanico es otra proteína derivada de la degradación de la filagrina e histidina libre. La filagrina es rica en

histidina y es la principal fuente de histidina para la formación de ácido trans-urocanico que participa en el mantenimiento de la hidratación de la piel y posiblemente en protección de rayos UV, modulación del pH y otras funciones.(43)

FUNCIÓN DE LA FILAGRINA

La filagrina tiene dos funciones principales, la primera es participar en la condensación del citoesqueleto de queratina, con lo que contribuye a la formación de la escama (38), y la segunda, es actuar como fuente de aminoácidos y derivados higroscópicos, con lo cual ayuda a la hidratación del estrato corneo.(37)

La filagrina es una proteína clave en la diferenciación y mantenimiento de la función de barrera.

7. RELACION DE LA FILAGRINA CON LA ICTIOSIS LIGADA AL X

En el 2007, Liao y cols, reportaron a dos medios hermanos, que padecían ILX, uno presentaba una escama fina, mientras que el otro mostraba un fenotipo notablemente más grave, ambos pacientes tenía mutación del gen *STS* y actividad nula de la enzima SE, sin embargo el paciente con fenotipo más grave, presentaba además mutación R501X en forma heterocigota del gen *FLG*. (42) Este hallazgo sugiere que la alteración

de otros genes que codifican para proteínas que participan en la diferenciación epidermal pueden incrementar la gravedad fenotípica en la ILX.

IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los pacientes con ILX presentan delección completa del gen *STS* y tienen una actividad enzimática indetectable, sin embargo, existe diferencia entre la gravedad de las manifestaciones clínicas.

En un estudio previo (42), se describen a dos medios hermanos con ILX, uno con un cuadro clínico leve y otro con uno más grave, en el último además de tener mutación del gen *STS*, presenta mutación en estado heterocigoto R501X en el gen *FLG* y proponen que la gravedad de la ILX está condicionada por la mutación adicional en el gen *FLG*.

Con base en estos antecedentes, el planteamiento de nuestro problema está dirigido a investigar si los pacientes con un cuadro clínico más grave de ILX, además de tener deletado el gen *STS* presentan la mutación R501X en el gen *FLG* y de esta manera conocer si el gen *FLG* participa como gen modificador de la gravedad de la ILX.

V. OBJETIVO GENERAL

Identificar si la mutación R501X en el gen *FLG*, en pacientes con ILX, están asociadas con la gravedad del fenotipo.

VI. HIPÓTESIS

Si los pacientes con ILX además de tener deletado el gen *STS*, tienen mutaciones en el gen *FLG*, tendrán un cuadro clínico grave que los que no la presentan.

VII. DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de investigación:

Se trata de un estudio prospectivo, descriptivo y transversal.

Universo:

Pacientes con diagnóstico de ILX que acudieron a consulta de genodermatosis en nuestro hospital y a los cuales se les había realizado estudio molecular del gen *STS* y resultaron con delección completa del gen y actividad nula de la enzima sulfatasa de esteroides.

Criterios de Selección:

a) Inclusión:

Pacientes con diagnóstico clínico y molecular de Ictiosis Ligada al X.

Pacientes con delección completa del gen *STS* y actividad enzimática nula.

Pacientes que acepten participar en este estudio mediante consentimiento informado.

b) Exclusión:

Pacientes que no acepten participar en el estudio.

c) Eliminación:

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

Variables del estudio:

a) Variable dependiente:

Pacientes con mutaciones en el gen *FLG*.

b) Variable Independiente:

Gravedad del cuadro clínico de pacientes con ILX.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Poblaciones incluidas en el estudio:

12 pacientes de la clínica de genodermatosis con diagnóstico clínico, enzimático y molecular de ILX y 2 controles sanos.

Previo consentimiento informado sobre su participación en este protocolo, cada individuo fue sometido a los siguientes estudios:

Evaluación genética:

- a) Historia clínica
- b) Árbol genealógico
- c) Exploración Física
- d) Evaluación dermatológica.
- d) Clasificación de la gravedad del cuadro clínico

2. Caracterización clínica de la gravedad de la Ictiosis ligada al X

En la actualidad no hay escalas que permitan distinguir los diferentes tipos de gravedad de la ILX por lo que se trataron de establecer criterios clínicos para realizar esta caracterización. Para clasificarla en leve, moderada y grave, se consideraron las características de la escama, como color, tamaño y si era fina o gruesa; la respuesta al tratamiento y modificación por el cambio climático. (Fig.2)

Fig.2 CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD CLINICA DE LA ICTIOSIS LIGADA AL X

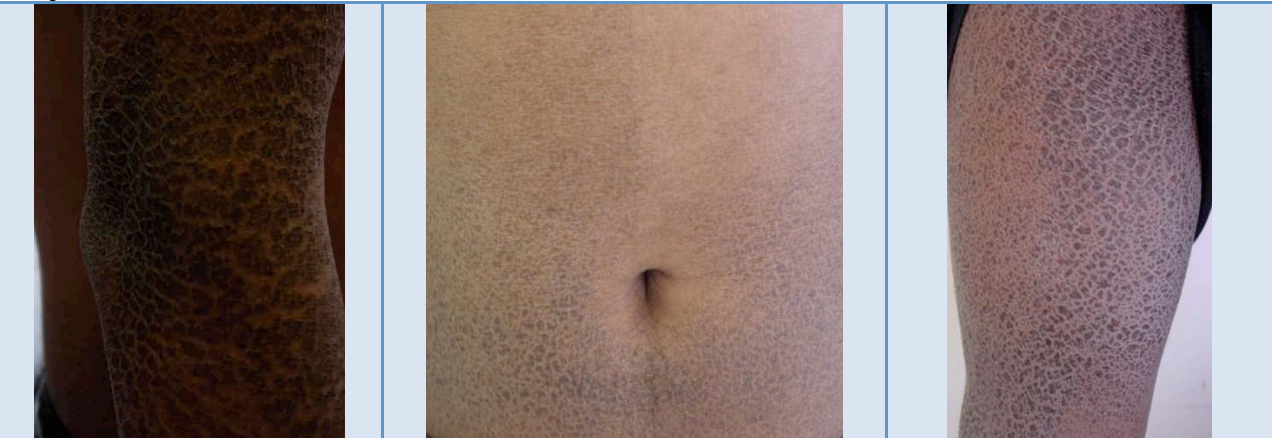
LEVE: Escama fina, clara y pequeña, responde bien al tratamiento y en clima cálido desaparece casi por completo.



MODERADA: Escama café clara, mediana que responde moderadamente a tratamiento tópico y en clima cálido mejora pero no desaparece.



GRAVE: Escama gruesa, café oscura, grande que tiene poca respuesta al tratamiento tópico y mejora levemente en el clima cálido.



3. Estudio molecular

Se utilizaron DNAs de los pacientes del banco de Ictiosis ligada al X del Servicio de Genética del Hospital General de México, que habían sido extraídos de linfocitos de sangre periférica mediante método salino.

Diseño de los oligonucleótidos

Típicamente un oligonucleótido mide de 15 a 25 pares de bases, mientras más largo, más especificidad y homología se tendrá con el gen deseado. Entre más pares de bases y mayor contenido de CG, más temperatura de alineación se necesita y la Taq polimerasa podría no funcionar correctamente. Es por esto que nosotros decidimos diseñar los oligonucleótidos con 21 pares de bases (Cuadro 2).

Tomamos una parte de la secuencia del exón 3 corriente arriba que flanquea la región codificada por el codón 501, de aproximadamente 21 pares de bases y otra región corriente abajo también de 21 pares de bases.

Utilizamos la base de datos NCBI, cuyo encabezado "blast" nos permite escanear el genoma. De esta forma, la base de datos nos indica qué tan homóloga es la secuencia que elegimos con alguna otra secuencia del genoma.

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

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

Cuadro 2. Primers del gen *FLG* para identificar la mutación R501X

Forward	5´ TCTGTGTGTTAGTCACAGTCC 3´
Reverse	5´ CCTGAGTGTCCAGACCTATTT 3´

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada una es realizada con un control y un blanco, con un volumen final 20 µl. A cada tubo se le agregan de 3 µl de DNA. El cuadro 3 es un ejemplo de una PCR de 20 µl. Las muestras 1 y 2 son pacientes, la muestra 3 es un control sano, y la 4 es un tubo que no contiene DNA, esto para asegurarnos que la reacción no esté contaminada y reducir el riesgo de obtener falsos positivos.

Cuadro 3. Ejemplo de una PCR de 20 µl.

Muestra	DNA	H2O	Buffer	dNTPs	F1	R1	Taq
1)1044	3	10.61	3	3	0.12	0.12	0.15
2)1184	3	10.61	3	3	0.12	0.12	0.15
3)Control	3	10.61	3	3	0.12	0.12	0.15
4)Blanco	0	10.61	3	3	0.12	0.12	0.15

La PCR se introduce en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

30 ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

Desnaturalización: 94 °C por 1 minuto

Alineación: 62°C por 1:30 minutos

Polimerización: 72 °C por 1:30 minutos

Extensión: 72°C por 2 minutos.

Obtuvimos la temperatura correcta de alineación para cada región mediante la siguiente fórmula (Cuadro 4):

$T_m: 4^{\circ}\text{C} (\text{G+C}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A+T})$

$T_m = \pm 5^{\circ}\text{C}$

Cuadro 4. Fórmulas para la temperatura de alineación

Primer	Fórmula	Temperatura final
<i>Forward</i>	$4^{\circ}\text{C} (5+5) + 2^{\circ}\text{C} (3+8) = 40+22 = 62^{\circ}\text{C}$	62°C
<i>Reverse</i>	$4^{\circ}\text{C} (4+6) + 2^{\circ}\text{C} (4+7) = 40+22 = 62^{\circ}\text{C}$	

Técnica de electroforesis.

Es la migración del DNA a través de un gel al aplicarse un campo eléctrico, en base a su carga y peso. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite analizar los productos de PCR por visualización de la banda deseada. Para cada producto de PCR del gen *FLG* se prepara un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

1. En un matraz de erlenmeyer colocamos agarosa con TAE 1x (tris, ácido acético glacial y EDTA), se calienta la muestra para disolverla. Dejamos enfriar la

solución y le agregamos bromuro de etidio en una cantidad equivalente a la cantidad de gel preparada.

2. Vaciamos la mezcla en un portagel y colocamos un peine con el número de pocillos requeridos. Esperamos a que solidifique.
3. Colocamos el gel en la cámara de electroforesis y vaciamos en ella suficiente TAE 1x como para cubrir totalmente el espesor del gel.
4. A cada tubo de PCR obtenido le agregamos 2 μ l de buffer de carga y mezclamos. Con una pipeta colocamos esta muestra en un pocillo. En el primer pocillo colocamos una escalera de 100pb como referencia.
5. Conectamos los electrodos y dejamos correr el gel a 70 volts por aproximadamente 20 minutos.
6. Después observamos en el transluminador de luz ultravioleta, donde todos los amplicones deben tener el peso requerido: 360pb.

Purificación de muestras

Los fragmentos de PCR del gen *FLG* deben ser purificados antes de su secuenciación para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzimas, DNA, etc.

Utilizamos resina y buffers Qiaex II.

1. Una vez visualizada en el transluminador, cortamos la banda del gel y la colocamos en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Le agregamos de 3 μ l de resina Qiaex II, más 400 μ l de buffer Qx1.
2. Dejamos incubar el tubo por 10 minutos a 50 °C. Lo centrifugamos a 10,000 rpm por 3 minutos.
3. Decantamos y colocamos 400 μ l del mismo buffer, se homogeniza la muestra. Lo centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos con pipeta para quitar cualquier resto de buffer.
4. Agregamos 400 μ l de buffer PE y disolvemos el botón. Centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos y repetimos el paso, retirando el buffer con pipeta.
5. Colocamos el tubo con la tapa abierta en el termoblock a 50 °C por aproximadamente 15 minutos, para secar la muestra. Le agregamos de 15 a 20 μ l de agua inyectable y resuspendemos el botón. Este tubo se dejará en reposo a temperatura ambiente por 24 horas.
6. Centrifugamos el tubo a 10,000 rpm durante 3 minutos y retiramos el sobrenadante, sin tocar el botón. La colocamos en un tubo para PCR.

Reacción con BigDye terminator.

Revisamos la muestra (templado) en un gel de agarosa para verificar su calidad. Si se considera que es suficiente, se mete en una reacción con BigDye de la siguiente manera (Cuadro 5):

Cuadro 5. Reacción con BigDye terminator.

REACTIVO	CANTIDAD
Mezcla de reacción BigDye	3 μ l
Templado	3.5 a 5 μ l
Oligonucleótido (10 mm)	1 μ l

La mezcla de BigDye contiene los siguientes reactivos:

- ddATP, ddTTP, ddGTP, y ddCTP marcados por fluorescencia.
- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)

- Tris-HCL (pH 9.0)
- MgCl₂
- Mutante de una taq polimerasa

El BigDye se introduce en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

25-ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

Desnaturalización: 94°C por 1 minuto

Alineación: 55°C por 10 segundos

Polimerización: 60°C por 4 minutos

Extensión: 60°C por 2 minutos.

Agregamos agua inyectable a la reacción final para aforarla a 20 µl.

Purificación

De esta manera eliminamos los dNTPs presentes en exceso, para permitir una secuencia más limpia y evitar errores en la interpretación de resultados.

1. A las columnas Centri Sep con cephadex (0.06 gr) les agregamos 800µl de agua inyectable. Las homogeneizamos con vórtex, y las dejamos reposar por una hora.

2. Retiramos el sobrenadante y centrifugamos las columnas durante 3 minutos a 3,000 rpm.
3. Con pipeta introducimos la reacción de BigDye en la columna, centrifugamos de nuevo por 3 minutos a 3,000 rpm, colocando debajo de la columna un tubo de secuenciación. Esto con la finalidad de que el exceso de ddNTPs se eliminen en la columna de cephadex, mediante una cromatografía en columna a pequeña escala. De esta manera se deposita ya purificada en el tubo de secuenciación.
4. Secamos la muestra colocando los tubos de secuenciación en un concentrador de vacío.
5. Posteriormente se sometió a secuenciación automatizada utilizando un secuenciador AB 310.
6. Se imprimieron los electroferogramas para ser analizados.

IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Todos los procedimientos están de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título segundo, capítulo 1, artículo 14, fracciones I-VIII).

Esta investigación se considera como de riesgo mínimo.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

XI.RESULTADOS

Evaluación Clínica:

Los resultados de la evaluación clínica se resumen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Evaluación clínica de los pacientes con ILX

	DNA	Edad	Manifestaciones no dermatológicas.	Asma, queratosis pilar, eczema, dermatitis atópica, asma.	Hiperlinealidad palmar	Padres con manifestaciones de ictiosis vulgar o alergias.	CLASIFICACIÓN DE GRAVEDAD
1	1044	18	No	No	No	No	Moderada
2	1184	19	No	No	No	No	Leve
3	1069	19	No	No	No	No	Moderada
4	1204	8	Criptorquidia	No	No	No	Moderada
5	1221	18	Criptorquidia	No	No	Si madre con hiperlinealidad y piel seca	Grave
6	1177	6	No	No	No	No	Moderada
7	1260	12	No	No	No	No	Moderada
8	1224	14	No	No	No	No	Leve
9	1051	5	No	No	No	No	Leve
10	1196	4	Criptorquidia	No	No	Si madre con hiperlinealidad y piel seca	Moderada
11	1225	13	No	No	No	No	Moderada
12	1211	5	No	No	No	No	Leve
13	Control	--	-----	--	--	--	--
14	control	--	-----	--	--	--	--

Se analizaron 12 muestras de pacientes de los cuales 1 presentaba un cuadro clínico grave, 7 moderado y 4 leve. Y 2 controles sanos.

Se amplificó mediante PCR la región de interés, que corresponde a un segmento de 360 pb (Figura 3) y posteriormente se realizó secuenciación (Figura 4). Ninguno de los

pacientes a pesar de tener diferentes tipos de gravedad presentó la mutación R501X en el gen *FLG*.

Fig. 3. Gel de agarosa con amplificación por PCR de la región de 360pb

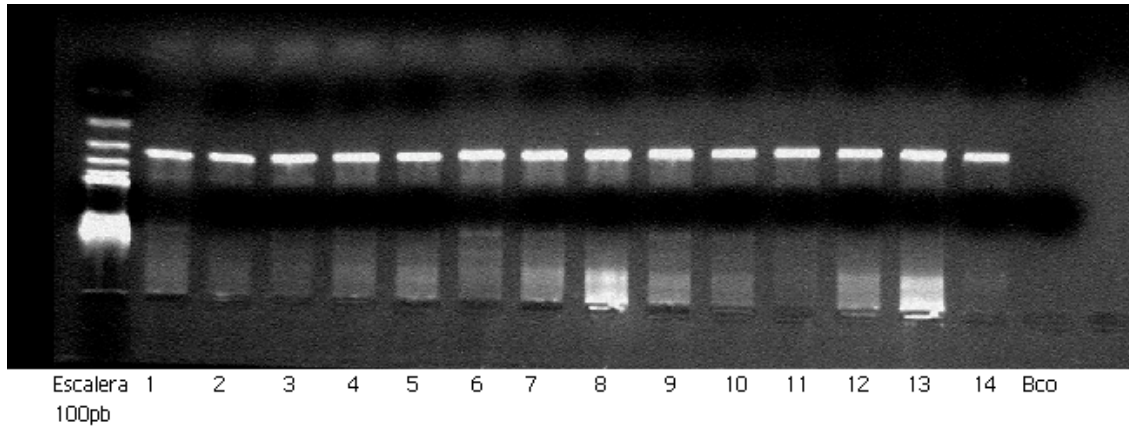
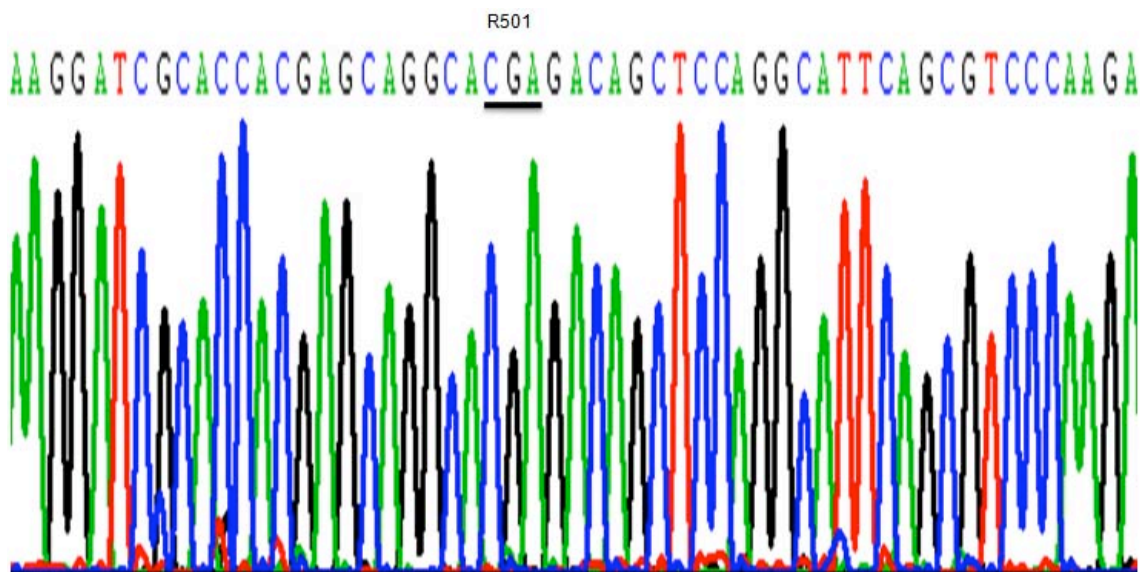


Fig. 4. Secuenciación de la región de interés



XII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron 12 pacientes con diagnóstico clínico de ILX y deleción completa del gen *STS*. Se realizó una valoración clínica de los pacientes para clasificar el padecimiento en leve, moderada y grave utilizando las características de la escama, respuesta al tratamiento y modificación de la escama condicionada por el clima. De este modo se incluyeron un paciente con cuadro grave, 7 con moderado y 4 con leve. Mediante PCR se amplificó una región de 360 pares de bases del gen *FLG* de la región donde se localiza la mutación reportada R501X, considerada la más frecuente en la IV.

En un estudio previo (42), se describen a dos medios hermanos con ILX, uno con un cuadro clínico leve y otro con uno más grave, en el último además de tener mutación del gen *STS*, presenta mutación en estado heterocigoto R501X en el gen *FLG* y proponen que la gravedad de la ILX está condicionada por la mutación adicional en el gen *FLG*.

Con base en estos antecedentes se buscó intencionadamente la mutación R501X en el gen *FLG* para corroborar si este gen está involucrado en la gravedad del cuadro clínico en nuestros pacientes con ILX.

La mutación R501X en el gen *FLG* es una mutación puntual y consiste en el cambio de una citosina por una timina en el nucleótido 1501. El codón original CGA que codifica para una Arginina cambia por el codón TGA que codifica para un codón de alto, provocando una proteína truncada.

Por un lado los pacientes con ILX presentan mutaciones en el gen *STS* que codifica para la enzima SE, que tiene un papel clave en la biosíntesis de lípidos que son esenciales en la formación y mantenimiento de la capa cornificada. La función de la enzima SE es remover el grupo sulfato del sulfato de colesterol. Los pacientes con ILX presentan actividad nula de esta enzima y muestran concentraciones de sulfato de colesterol 10 veces mayor y una reducción de colesterol del 50% en la epidermis, alterando con esto la adhesión intercelular y provocando una función de barrera anormal.

Los pacientes con IV presentan mutaciones en el gen *FLG* que codifica para la filagrina que es el componente principal de los gránulos de queratohialina, estos pacientes presentan haploinsuficiencia de la filagrina que conlleva a una formación anormal de escama, una hidratación alterada del estrato córneo y una función de barrera anormal.

El gen *STS* y *FLG* están involucrados en dos tipos de ictiosis clínicamente diferentes y actúan en dos vías completamente separadas, una a nivel de lípidos y otra a nivel de proteínas pero ambas participan en la adecuada cornificación de la epidermis y apropiado funcionamiento de barrera de la piel. Si se acumula sulfato de colesterol y además coexiste un déficit de filagrina en la epidermis, podrían haber un efecto sinérgico condicionando un cuadro clínico más grave.

La IV tiene un patrón de herencia semidominante, por lo que los pacientes que presentan mutaciones en el gen *FLG* en estado heterocigoto tienen un cuadro clínico leve, refiriendo en ocasiones sólo piel seca e hiperlinealidad palmar que por lo general no se interroga si algún miembro de la familia presenta alguno de ellos. Mientras los pacientes con mutaciones homocigotas tienen un cuadro más florido de IV. En el

estudio de Liao la madre de los pacientes reportados solo refería piel seca e hiperlinealidad palmar, ella además de ser portadora de ILX presentaba la mutación R501X en el gen *FLG*. En nuestro estudio se preguntó intencionadamente si algún miembro de la familia presentaba alguno de estos síntomas. Se encontró que las madres de dos pacientes, uno con fenotipo moderado y otro con fenotipo grave presentaban piel seca e hiperlinealidad palmar. Estos datos sugerían que el gen *FLG* podía estar involucrado en los diferentes tipos de gravedad de nuestros pacientes.

No sólo es importante establecer si los pacientes tienen ambas mutaciones para saber si este condiciona la gravedad del padecimiento, sino que también es relevante establecer el genotipo para brindar un asesoramiento genético adecuado, ya que este es diferente si se tiene mutación en ambos genes o si sólo presenta mutación en el gen *STS*, por distinto patrón de herencia que presentan la ILX e IV.

En este estudio no encontramos la mutación R501X en el gen *FLG*, en alguno de los 12 pacientes estudiados a pesar de tener diferentes tipos de gravedad, por lo que descartamos que esta mutación sea la causante de un cuadro clínico más grave en nuestros pacientes.

En la literatura existen pocos estudios del gen de la filagrina como modificador de la gravedad de los pacientes con ILX, por eso motivo consideramos que era de gran importancia buscar en nuestros pacientes la mutación reportada, ya que se desconoce porque existen diferencias fenotípicas entre estos pacientes. Sin embargo cabe resaltar que no encontramos la mutación R501X en el gen *FLG* en nuestros pacientes, principalmente en el paciente con fenotipo grave que además presentaba historia

familiar de madre con hiperlinealidad palmar y piel seca, que sugerían fuertemente que el gen *FLG* pudiera estar alterado e involucrado en la gravedad. Con los hallazgos de este trabajo confirmamos que la mutación R501X en el gen *FLG* no es la causante del fenotipo más grave en nuestro paciente.

En este trabajo contrario a lo reportado por Liao no encontramos una relación entre la gravedad de la ILX y la mutación R501X en el gen *FLG*, sin embargo, no podemos descartar que la filagrina esté involucrada como gen modificador de la gravedad de la ILX ya que solo estudiamos una mutación en este gen, sería conveniente en estudios futuros buscar otras mutaciones reportadas en este mismo gen, especialmente en las familias donde se encontró que madres referían piel seca e hiperlinealidad palmar, ya que estos datos sugieren que puede haber otras mutaciones en el gen *FLG* presentes en estas familias que condicionen un cuadro clínico más grave.

XIII. CONCLUSIÓN

En este estudio no se encontró la mutación R501X en los 12 pacientes estudiados con diagnóstico clínico y molecular de ILX con diferentes tipos de gravedad del padecimiento.

Se descarta que la mutación R501X en el gen *FLG* sea la responsable de un cuadro clínico más grave en nuestros pacientes.

No se descarta el gen *FLG* como gen modificador de la ILX en estos pacientes ya que en este trabajo sólo se analizó la mutación R501X, por lo que sería conveniente que en un estudio futuro se analizaran otras mutaciones en este gen

En la literatura existen pocos estudio donde se propone que mutaciones en el gen *FLG* pueden contribuir a la gravedad de la ILX, es por eso que este trabajo es importante, ya que se descarta que en nuestros pacientes los diferentes tipos de gravedad estén condicionados por la mutación R501X adicional en el gen *FLG*.

XIV. REFERENCIAS

1. Ganemo A. Hereditary ichthyosis. Causes, Skin Manifestations, Treatments and Quality of Life. *Acta Universitatis Upsaliensis*. 2002;554:5246-9
2. Cockayne EA. Inherited Abnormalities of the Skin and its Appendages. London: Oxford University Press, 1933.
3. Wells RS, Kerr CB. Genetic classification of ichthyosis. *Arch Dermatol* 1965; 92: 1-6.
4. France JT, Liggins GC. Placental sulphatase deficiency. *J Clin Endocr Metab* 1969; 29: 139-41.
5. Jöbsis AC, Duuren Y, De Vries GP. Trophoblast sulphatase deficiency associated with X-chromosomal ichthyosis. *Ned T Geneesk* 1976; 120: 45.
6. Koppe JG, Marinkovic-Ilsen A, Rijken Y. X-linked ichthyosis. *Arch Dis Child* 1978; 53: 803-6.
7. Shapiro LJ, Weiss R, Webster D, France JT. X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *Lancet* 1978; 14: 70-2.
8. Schmuth M, Gruber R, Peter M. Ichthyosis Update: Towards a Function-Driven Model of Pathogenesis of the Disorders of Cornification and the Role of Corneocyte Proteins in These Disorders. *Advances in Dermatology* 2007;23:231–256.
9. Hunter J.A.A. The function and structure of the skin. In: *Clinical Dermatology*. Second edition, Blackwell Science Ltd, Oxford. 1995; 2: 5-20
10. Haake A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin*. 2000;1:133-156

11. Hoyer H, Likkesfeldt G, Ibsen HH, Brandrup F. Ichthyosis of steroid sulphatase deficiency. Clinical study of 76 cases. *Dermatol* 1986; 172: 184-90.
12. Wells RS, Jennings MC. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris. *JAMA* 1967; 202: 485-8.
13. García-Bravo B, Unamuno P, Ictiosis X. *Monogr Dermatol* 1991; 1: 27-37.
14. Mevorah B, Krayenbuhl A, Van Bovey EH, Melle GD. Autosomal dominant ichthyosis and X-linked ichthyosis. *Acta Derm Venereol* 1991; 71: 431-4.
15. Okano M, Kitano Y, Yoshikawa K. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris: comparison of their clinical features based on biochemical analysis. *Br J Dermatol* 1988; 119: 777-83.
16. Hernández-Martín A, González-Sarmiento R, De Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol* 1999;141(4): 617-627.
17. Piccirilo A, Auricchio L, Fabroccino G et al. Ocular findings and skin histology in a group of patients with X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol* 1988; 119: 185-8.
18. Costagliola C, Fabroccini C, Illiano GMP. Ocular findings in X-linked ichthyosis: a survey of 38 cases. *Ophthalmol* 1991; 202: 152-5.
19. Jay B, Blach RK, Wells RS. Ocular manifestations of ichthyosis. *Br J Ophthalmol* 1968; 52: 217-26.
20. Unamuno P, Martín-Pascual A, García-Pérez A. X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol* 1975; 97: 53-8.
21. Sever RJ, Frost P, Weinstein G. Eye changes in ichthyosis. *JAMA*. 1968; 206: 2283-6.

22. Traupe H, Ropers HH. Cryptorchidism and hypogonadism in X-linked recessive ichthyosis vulgaris. (Letter) *Hum Genet* 1982; 60: 206.
23. Unamuno P, Martín C, Fernández E. X-linked ichthyosis and cryptorchidism. *Dermatol* 1986; 172: 326-7.
24. Traupe H, Happle R. Mechanism in the association of cryptorchidism and X-linked recessive ichthyosis. *Dermatol* 1986; 172: 327-8.
25. Lynch HT, Ozer F, McNutt CW. Secondary male hypogonadism and congenital ichthyosis: association of two rare genetic diseases. *Am J Hum Genet* 1960; 12: 440-7.
26. García-Pérez A, Crespo M. X-linked ichthyosis associated with hypertrophic pyloric stenosis in three brothers. *Clin Exp Dermatol* 1981; 6: 159-61.
27. Stoll C, Grosshans E, Binder P, Roth MP. Hypertrophic pyloric stenosis associated with X-linked ichthyosis in two brothers. *Clin Exp Dermatol* 1983; 8: 61-4.
28. Mallory SB, Kletzel M, Turley CP. X-linked ichthyosis with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dermatol* 1988; 124: 22-4.
29. Bousema MT, van Oranje AP, Diggelen OP. X-linked ichthyosis and congenital abdominal wall defects. *Int J Dermatol* 1991; 30: 53.
30. Paige DG, Emilion GG, Bouloux PMG, Harper JI. A clinical and genetic study of X-linked recessive ichthyosis and contiguous gene defects. *Br J Dermatol* 1994; 131: 622-9.
31. Yen PH, Allen E, Marsh B, 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: 443-454.

32. Chang PL, Varey PA, Rosa NE, Ameen M, Davidson RG. Association of steroid sulfatase with one of the arylsulfatase C isozymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;261:14443-14447.
33. France JT. Steroid sulphatase deficiency. *J Steroid Biochem* 11: 647-51,1979.
34. Williams ML. Epidermal lipids and scaling diseases of the skin. *Semin Dermatol* 1992;11: 169-175.
35. Zhong W, Cui B, Zhang Y, Jiang H, Wei S, Bu L, Zhao G, Hu L, Kong X. Linkage analysis suggests a locus of ichthyosis vulgaris on 1q22. *J Hum Genet* 2003; 48: 390-392.
36. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunsuksiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem* 1992;267:23772–23781.
37. Listwan P, Rothnagel JA. Keratin bundling proteins. *Methods Cell Biol* 2004;78:817–27.
38. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4097–4101.
39. Nomura T, Sandilands A, Akiyama M. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol* 2007;119 (2): 434–40.

40. Sybert VP, Dale BA, Holbrook KA. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J Invest Derm* 1985;84: 191-194.
41. Smith F, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature Genet* 2006;38: 337-342.
42. Liao H, Waters AJ, Goudie DR, Aitken DA, Graham G, Smith F. Filaggrin Mutations Are Genetic Modifying Factors Exacerbating X-Linked Ichthyosis. *J Invest Derm* 2007;191-194.
43. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* 2009 May 1;122:1285-94.