



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Caracterización epidemiológica y molecular de ictiosis lamelar en  
Pajapan, Veracruz**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Mirena Cristina Astiazarán Osornio**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz- Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de  
Valenciana IAP”**

**CO-TUTOR**

**Dr. Carlos Alberto Pantoja Meléndez- Facultad de Medicina**

**Ciudad de México, abril 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Tabla de contenido

Resumen .....	3
1. Marco teórico.....	5
<b>1.1 Generalidades del genoma humano</b> .....	5
<b>1.2 Enfermedades Mendelianas</b> .....	6
1.2.1 Enfermedades con herencia autosómica recesiva.....	6
<b>1.3 Aislados poblaciones con enfermedades autosómica recesivas</b> .....	7
2. Antecedentes.....	10
<b>2.1 Ictiosis lamelar en Veracruz</b> .....	10
<b>2.2 Ictiosis</b> .....	10
2.2.1 Ictiosis Congénitas Autosómica Recesivas (ARCI, por sus siglas en inglés).....	13
2.2.2 Ictiosis lamelar (IL) .....	19
<b>2.3 Técnicas de biología molecular</b> .....	21
2.3.1 Secuenciación Sanger .....	21
2.3.2 Secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) .....	22
3. Planteamiento del problema .....	23
4. Pregunta de investigación.....	23
5. Justificación.....	24
6. Objetivos .....	24
7. Metodología .....	25
7.1 Fase 1- Identificación de Personas con Ictiosis Lamelar.....	25
7.2 Fase 2- Identificación de las Mutaciones Causales.....	25
7.3 Fase 3- Determinación de frecuencia de portadores en Pajapan, Veracruz.....	30
8. Resultados .....	32
8.1 Resultados de la Fase 1- Identificación de Pacientes Enfermos con IL en Pajapan	32
8.2 Resultados de la Fase 2- Identificación de variante patogénica causal.....	40
8.3 Resultados de la Fase 3- Identificación de Portadores de la variante c.427C>T en Pajapan.....	43
9. Discusión .....	47
10. Bibliografía.....	56
11. Anexos .....	62
11.1 Historia Clínica .....	62
11.2 Consentimiento informado .....	67
11.3 Cuestionario.....	68

## Resumen

**Marco teórico y Antecedentes:** La consanguinidad y la endogamia, favorecidas por aislamiento geográfico y/o cultural, son situaciones que aumentan la probabilidad de aparición de enfermedades autosómicas recesivas en una población. El estudio de este tipo de poblaciones ha permitido identificar genes causales de enfermedades raras y/o con heterogeneidad genética porque su incidencia es mucho más alta que en la población general. Observaciones preliminares por nuestro grupo de estudio han identificado una zona en México con una frecuencia particularmente alta de una enfermedad autosómica recesiva. En Pajapan, Veracruz existe un número elevado de personas afectadas con ictiosis laminar (IL OMIM #242300) la cual se clasifica dentro de las ictiosis congénitas autosómicas recesivas (ARCI, por sus siglas en inglés) y tiene una incidencia a nivel mundial de 1/100,000 y 1/200,000. A la fecha existen 9 genes asociados a la IL pero el más común es *TGMI* (14q11.2). Es probable que esta situación en el estado de Veracruz se deba a un efecto de mutación fundadora como se ha comprobado con otras enfermedades y en otras regiones del país.

**Justificación:** La ictiosis lamelar es una enfermedad de origen genético y la identificación de la mutación causal contribuirá al conocimiento de sus características moleculares. Así mismo, el conocimiento de la causa genética permitirá la detección de portadores lo cual es fundamental para el asesoramiento genético. Lo anterior también permitirá plantear la hipótesis acerca del mecanismo que llevó a la introducción de la mutación.

**Planteamiento del problema:** En México existen poblaciones con características que favorecen la presencia de enfermedades autosómicas recesivas como la endogamia, la consanguinidad y el aislamiento geográfico o sociocultural. Un ejemplo es Pajapan, Veracruz en donde existe una frecuencia alta de ictiosis lamelar. En ocasiones estas enfermedades pueden tener como origen una mutación fundadora lo cual tiene implicaciones para generaciones futuras. En Pajapan no se conoce la prevalencia de la enfermedad, la causa genética, ni la frecuencia de portadores.

**Pregunta de investigación:** ¿La alta frecuencia de ictiosis lamelar en Pajapan, Veracruz es debida a una mutación fundadora?

**Objetivos:** Objetivo general: Determinar si la frecuencia alta de ictiosis lamelar en Pajapan, Veracruz es consecuencia de una mutación fundadora.

Objetivos específicos: 1. Determinar la prevalencia de pacientes con IL en Pajapan. 2. Identificar la mutación causal de la IL. 3. Estimar la tasa de portadores de la mutación en la población.

**Metodología:** Se planteó el estudio de esta población en tres fases: 1. Describir las características clínicas de los afectados y construir las genealogías correspondientes. 2. Identificar las mutaciones causales utilizando las herramientas de análisis genético de secuenciación de exoma completo y secuenciación Sanger. 3. Determinar la tasa de portadores en la población mediante secuenciación Sanger directa de la mutación causal en una muestra representativa de sujetos sanos de la población.

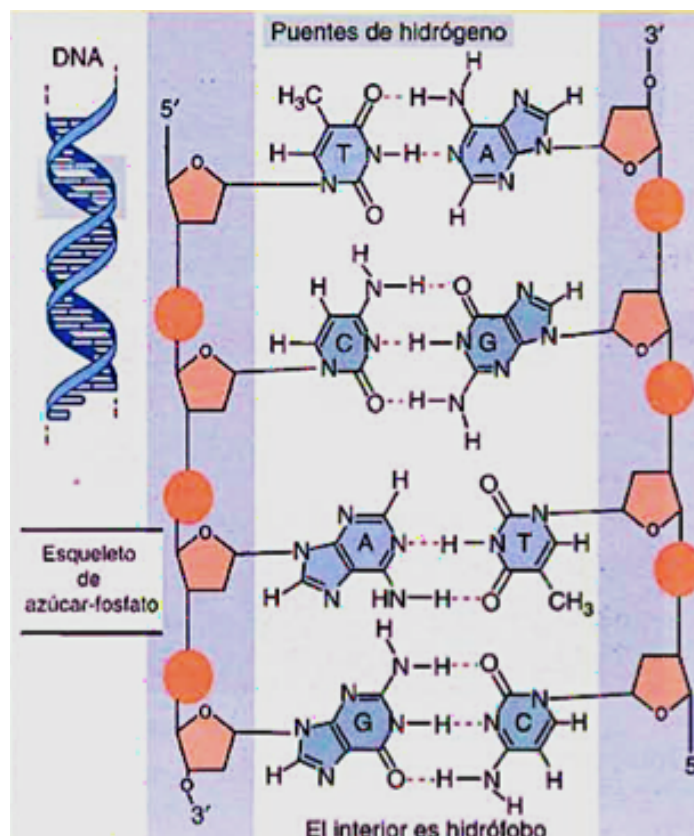
**Resultados:** Se identificaron nueve individuos con IL pertenecientes a cinco familias diferentes. De acuerdo al número de casos identificados con IL y sobre la base

poblacional de Pajapan, se obtuvo una prevalencia de 1.07 casos por cada 1,000 habitantes. Por secuenciación de exoma completo se identificó una variante intrónica en el gen *TGMI* en un paciente con IL de otro poblado de Veracruz. Se investigó la variante en los pacientes de Pajapan pero al no estar presente se procedió a secuenciar el gen *TGMI* completo. En 3 familias se identificó la variante c.427C>T p.(Arg143Cys) en el exón 3 en estado homocigoto; una familia es heterocigoto compuesto con la misma variante en asociación con la variante c.760G>A p.(Asp254Asn) en el exón 5; y una familia homocigota para c.760G>A. Posteriormente se realizó el muestreo en Pajapan para identificación de individuos portadores para la variante c.427C>T. Los resultados arrojaron una prevalencia de 78 portadores por cada 1,000 habitantes en Pajapan, Veracruz.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Generalidades del genoma humano

La información genética en los seres humanos se encuentra contenida en el ácido desoxirribonucleico o DNA el cual tiene una estructura en doble hélice que de manera extendida mide aproximadamente 2 metros. El DNA se enrolla para disponerse en un núcleo de aproximadamente 10 $\mu$ m; cada cadena de la doble hélice, entre otros componentes, está formada por las bases nitrogenadas que son adenina, timina (la cual se reemplaza en el RNA por uracilo), guanina y citosina. Las bases nitrogenadas son complementarias, es decir, las adeninas de una cadena forman enlaces de tipo puente de hidrógeno con las timinas de la otra cadena y las guaninas con las citosinas. Las bases nitrogenadas se unen con una pentosa y un grupo fosfato para formar un nucleótido, así las cadenas del DNA están formadas por polinucleótidos (Frank-Kamenetskii, 2002, Del Castillo-Ruiz, 2012) (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura del DNA. Se muestran los nucleótidos evidenciando la complementariedad entre las bases nitrogenadas adenina y timina (A-T) y guanina y citosina (G-C), formando puentes de hidrógeno entre las dos cadenas (Imagen modificada de Lewin, 2008).

Al orden que llevan los polinucleótidos se le denomina secuencia de DNA, y a la unidad funcional del DNA se le denomina gen. Con el advenimiento de técnicas nuevas que han permitido estudiar a fondo los genomas, la definición de un gen ha resultado ser más compleja. En general se define como una región en el genoma cuya transcripción es regulada, y que contiene información para la síntesis de productos funcionales que pueden compartir información genética entre sí (Pesole, 2008). Los genes están compuestos por exones e intrones. Los exones son las regiones que codifican por medio de codones para un aminoácido.

El DNA interactúa con proteínas para empaquetarse y mantenerse en el núcleo de las células eucariontes; la interacción del DNA con proteínas constituye la cromatina (Gilchrist & Bickmore, 2006). El máximo grado de compactación de la cromatina son los cromosomas. En los seres humanos el DNA se distribuye en 23 pares de cromosomas, 22 de los cuales son autosomas y 1 par es de cromosomas sexuales, XX o XY (Speicher y Carter, 2005). Así, tenemos dos copias de cada gen, una en cada cromosoma, las cuales se llaman alelos. Cuando los alelos tienen la misma secuencia de nucleótidos se dice que tienen un genotipo homocigoto. Por el contrario, cuando los alelos son diferentes están en estado heterocigoto.

## **1.2 Enfermedades Mendelianas**

Se estima que el genoma humano contiene entre 20,000 y 25,000 genes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Las enfermedades Mendelianas o monogénicas son aquellas en las que una mutación en un gen es responsable de la enfermedad. Este grupo de enfermedades genéticas se clasifican de acuerdo a su patrón de herencia en autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X. La primera herramienta en genética clínica para conocer el tipo de herencia de una enfermedad es el árbol genealógico (Chial, 2008).

### **1.2.1 Enfermedades con herencia autosómica recesiva**

Para que una enfermedad con herencia autosómica recesiva se presente es necesario que ambas copias del gen, es decir ambos alelos, se encuentren mutados. Existen más de 4000 enfermedades reportadas con este tipo de herencia (OMIM <https://omim.org/>, marzo 2019). Si un individuo tiene un solo alelo mutado se denomina “portador” y no

tendrá signos y síntomas de la enfermedad recesiva. Por cada embarazo entre dos individuos portadores el riesgo de tener un hijo enfermo, sano portador o sano no portador es del 25%, 50% y 25% respectivamente. La consanguinidad y la endogamia, favorecidas por aislamiento geográfico y/o cultural, son situaciones que aumentan la probabilidad de aparición de enfermedades autosómicas recesivas en una población porque la presencia de portadores es mayor que en la población general. A esto le llamaremos aislamiento reproductivo. En la genética clínica, una definición de la consanguinidad es la unión reproductiva entre dos individuos que son primos en segundo grado o más cercanos con un coeficiente de consanguinidad igual o mayor a 0.0156 (1/64) (Bittles, 2001). En términos generales, el término viene del latín *consanguinitas* (*con-* compartido y *sanguis-* sangre) y se refiere a la unión reproductiva entre dos individuos que descienden de un ancestro común. La definición de la endogamia es más ambigua y se puede referir a la unión matrimonial entre dos individuos de una comunidad definida (Bittles, 2005), a la unión entre individuos que son primos en segundo grado o más cercanos (Jollant & Macdonald, 2015) o al tamaño de una población endogámica que es de menos de 5,000 habitantes. El estudio de este tipo de poblaciones ha permitido identificar genes causales de enfermedades raras y/o con heterogeneidad genética porque la variación genética de la población es menor y porque la incidencia de enfermedades raras es más alta que en la población general. (Petukhova et al., 2009).

### **1.3 Aislados poblacionales con enfermedades autosómica recesivas**

En las poblaciones reproductivamente aisladas se observan genomas más homogéneos en comparación con la población general pudiendo ser el aislamiento tanto geográfico como sociocultural. Generalmente esto es consecuencia de varias situaciones como la endogamia, la consanguinidad y las tasas bajas de migración (Hatzikotoulas, Gilly, & Zeggini, 2014) (Figura 2). Los aislados genéticos de población se definen como grupos de individuos que descienden de pequeños grupos de individuos (grupo fundador) y que han mantenido un grado relativo de homogeneidad genética debido a su aislamiento geográfico y/o cultural a través de numerosas generaciones. Un grupo fundador incluye aquellos habitantes que tienen sus orígenes en un “cuello de botella” de individuos, comúnmente dentro de las últimas 100 generaciones (Peltonen, 1995; Arcos-Burgos & Muenke, 2002). El término “cuello de botella” en la genética de poblaciones hace



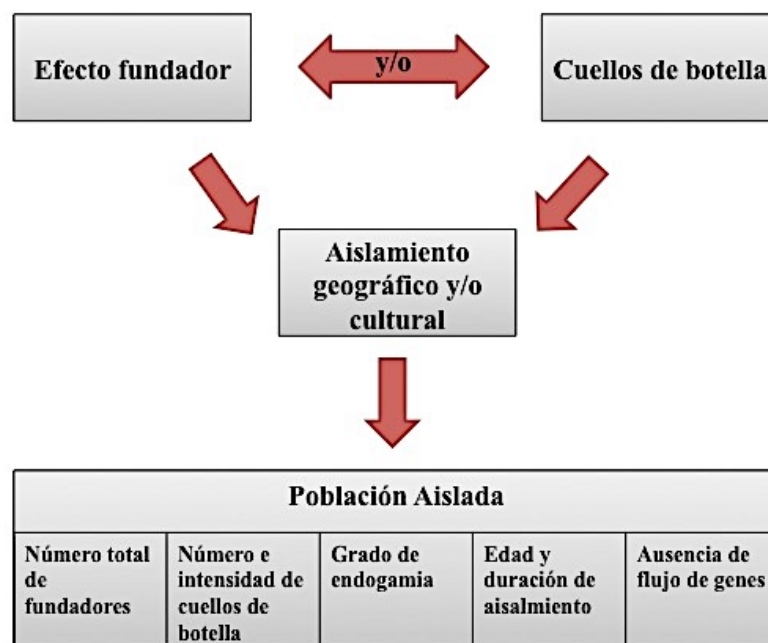
referencia a la reducción dramática en el tamaño de una población por enfermedad, guerra, desastres naturales, migraciones, conquista de una población a otra, etc. Una característica de los aislados poblacionales son las mutaciones fundadoras las cuales se definen como variantes genéticas que están presentes con una frecuencia más alta en una población aislada que en la población general, en donde uno o más ancestros eran portadores de dicha variante ([www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary)). Un ejemplo de un aislado poblacional religioso son los judíos Ashkenazi en EEUU en quienes la frecuencia de portadores de la enfermedad de Tay-Sachs es de 1/31 mientras que en la población general estadounidense es de 1/360,000 (Petersen et al., 1983). Por otro lado, en la población finlandesa la cual se considera geográficamente aislada, se encontraron 32 loci para enfermedades Mendelianas muy raras y 17 genes causales, todos con mutaciones fundadoras y una tasa de portadores alta. Todos los alelos se identificaron porque presentaban desequilibrio de con múltiples polimorfismos flanqueando los *loci* de las enfermedades (Peltonen, Jalanko, & Varilo, 1999).

El estudio de estas comunidades en años recientes ha permitido obtener resultados notables en el mapeo de genes causantes de enfermedades genéticas, especialmente aquellas que tienen herencia autosómica recesiva. Los logros iniciales que se originaron principalmente por el análisis de aislados poblacionales como los finlandeses y los Amish, aumentaron el interés en este tipo de poblaciones. Las poblaciones genéticamente aisladas ofrecen muchas ventajas para estudios de mapeo amplio del genoma ya que la mayoría de ellas se originan de un efecto fundador y el alto grado de endogamia ha derivado en un aumento en la incidencia de enfermedades autosómicas recesivas (Peltonen, 2000).

Un ejemplo de hace más de treinta años fue la identificación de la asociación entre hipoacusia y mutaciones en el gen *GJB2*, el cual codifica para la conexina 26. Se estudió un aislado poblacional de 8000 habitantes en Israel el cual se caracterizaba por ser Musulmán-Árabe y con una frecuencia muy elevada de matrimonios consanguíneos. Se investigaron 20 familias de la comunidad con hipoacusia y se encontraron dos mutaciones fundadoras en *GJB2*, con lo cual se comprobó la etiología de la enfermedad (Carrasquillo, Zlotogora, Barges, & Chakravarti, 1997).

En ningún país de Occidente se han estudiado tanto los aislados poblacionales y las enfermedades genéticas como en Finlandia. Este país nórdico tiene una colección de 36 enfermedades hereditarias raras que están sobrerrepresentadas y se les conoce en conjunto como el *Finnish Disease Heritage* (FDH, patrimonio de enfermedades

Finlandesas). Existen regiones del país en donde se cree que casi todos los pobladores son descendientes de algunas familias originales que migraron en los años 1500. Como consecuencia, existen pacientes con enfermedades autosómicas recesivas sumamente raras en el resto del mundo pero con una incidencia alta en Finlandia. Es interesante destacar que la incidencia de fibrosis quística es una décima parte de la de otros países en Europa y que sólo se han reportado 10 pacientes finlandeses con fenilcetonuria (Norio, 2003b). Algunos ejemplos enfermedades casi exclusivas de pacientes finlandeses son el síndrome GRACILE (OMIM #603358; 20 pacientes finlandeses conocidos todos con la misma mutación), distrofia muscular tibial (OMIM #; más de 300 conocidos en Finlandia, sólo 6 familias en otros países), enanismo Mulibrey (OMIM #253250; 98% de todos los pacientes finlandeses tienen la misma mutación; menos de 20 pacientes reportados en otros países) y cornea plana congénita tipo 2 AR (OMIM #217300; 90 familias finlandesas, todas con la misma mutación) (Norio, 2003a). El estudio intensivo del FDH ha permitido identificar genes asociados a enfermedades y este mapeo genético ha tenido un impacto en la población fuera de Finlandia.



**Figura 2.** Factores que influyen la formación de una aislado poblacional (Tomado y modificado de (Hatzikotoulas et al., 2014).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Ictiosis lamelar en Veracruz

Observaciones preliminares por nuestro grupo han identificado una zona en México con alta endogamia y una incidencia particularmente alta de una enfermedad rara autosómica recesiva previamente descrita. En los poblados de Pajapan, Nogales, Atzompa, Altamira e Ixhuatlán en Veracruz existe un número elevado de personas afectadas con ictiosis lamelar. Existen múltiples reportajes por noticieros en donde se expone la problemática de esas regiones (Alor, 2015; Libonatti, 2015) sin embargo, a nuestro conocimiento no se han realizado estudios genéticos para identificar la causa de la enfermedad. Dada las características demográficas de estas regiones, es probable que este fenómeno también se deba a un efecto de una mutación fundadora, como ha sido demostrado en ciertas enfermedades genéticas en otras regiones del país (Pantoja-Melendez, Ali, & Zenteno, 2013).

### 2.2 Ictiosis

La epidermis es un epitelio altamente especializado y estratificado que protege al cuerpo de la pérdida de agua y de agresiones físicas, químicas y mecánicas. Para el mantenimiento de estas funciones, los queratinocitos sufren el proceso de cornificación durante el cual las células migran desde la capa basal hasta la superficie formando la capa córnea y finalmente mueren y se desprenden. En condiciones normales, la proliferación celular y la descamación están en equilibrio (Richard, 2004).

El término ictiosis deriva de la raíz griega “*ichthys*” que significa pez y lleva más de 200 años en uso para describir a todas aquellas enfermedades que cursan con una descamación generalizada de la piel. Existen descripciones en literatura médica antigua griega, india y china de pacientes con piel que asemeja escamas de un pez o piel de serpiente (Shwayder & Ott, 1991). A principios de los años 20, científicos europeos definieron la queratinización de la epidermis en la ictiosis en general. Los términos de ictiosis lamelar y de hiperqueratosis epidermolítica, entre otros, fueron utilizados por primera vez en 1966 por un grupo de dermatólogos estadounidenses que iniciaron la labor de clasificar y describir histopatológicamente este grupo de enfermedades (Frost, Weinstein, & Van Scott, 1966).

Las ictiosis son un grupo heterogéneo de trastornos de la queratinización caracterizadas por apariencia de “escama” generalizada, piel seca, hiperqueratosis y en ocasiones eritrodermia (Takeichi y Akiyama, 2016). Esta apariencia de la piel es debida a un desorden de la cornificación con una diferenciación y descamación anormal de la epidermis y, como consecuencia, una acumulación excesiva de grandes cantidades de escamas o células muertas en su capa más superficial.

Existen formas adquiridas y heredadas, de presentación al nacimiento o de desarrollo en etapas posteriores y puede ocurrir como una patología aislada o en asociación con anomalías en otros órganos o sistemas. Existen algunos tipos bien definidos clínicamente que pueden ser diagnosticados con relativa facilidad, sin embargo, debido a la gran variabilidad clínica el diagnóstico preciso puede ser mas difícil. La nosología aceptada está basada en la clínica, ya que en la actualidad el diagnóstico molecular no está disponible para todas las formas de ictiosis y el estudio genético puede verse obstaculizado por falta de acceso y el costo.

Las ictiosis heredadas son enfermedades Mendelianas clínica y etiológicamente heterogéneas y se clasifican de acuerdo a la Primera Conferencia de Consenso de Ictiosis, 2009 (Oji et al., 2010) en dos grandes grupos: las formas no sindrómicas, que se manifiestan exclusivamente en la piel y las sindrómicas, en las que aparecen anomalías extracutáneas asociadas. Dentro de las formas no sindrómicas se diferencian cuatro entidades: las ictiosis comunes, las ictiosis congénitas autosómicas recesivas, las ictiosis queratinopáticas y otras formas de ictiosis menos frecuentes (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de ictiosis no sindrómicas con algunos ejemplos (Modificada de (Oji et al., 2010).

<b>Enfermedad</b>	<b>Modo de herencia</b>	<b>OMIM</b>
<u>Ictiosis comunes/ de inicio tardío</u>		
<b>Ictiosis vulgaris</b>	Autosómica dominante	#146700
<b>Ictiosis ligada al X</b>	Ligada al X	#308100
<u>Congénitas autosómica recesivas</u> <i>Variantes mayores</i>		
<b>Arlequín</b>	Autosómica recesiva	#242500
<b>Lamelar</b>	“	#242300
<b>Eritrodermia ictiosiforme</b>	“	#242100
<i>Variantes menores</i>		
<b>Bebé colodión autoresolutivo</b>	“	*
<b>Bebé colodión acral autoresolutivo</b>	“	*
<b>En traje de baño</b>	“	*
<u>Queratinopáticas</u> <i>Variantes mayores</i>		
<b>Epidermolítica</b>	Autosómica dominante	#113800
<b>Epidermolítica superficial</b>	“	#146800
<i>Variantes menores</i>		
<b>Epidermolítica anular</b>	“	#113800
<b>Curth-Macklin</b>	“	#146590
<b>Epidermolítica AR</b>	Autosómica recesiva	#113800
<b>Nevo epidermolítico</b>	Somática	*

OMIM- Online Mendelian Inheritance of Man \* No cuenta con número OMIM

### 2.2.1 Ictiosis Congénitas Autosómica Recesivas (ARCI, por sus siglas en inglés)

En Estados Unidos se estima una prevalencia de 1/200,000 individuos para las ARCI como grupo. La ictiosis arlequín es la más rara y se presenta en 1/1,000,000 de nacimientos (Richard y Bale, 2001; Oji y Traupe, 2009). Estudios epidemiológicos en Noruega y Galicia encontraron mutaciones fundadoras como responsables de prevalencias particularmente altas de ictiosis lamelar con resultados de 1/91,000 y 1/122,000, respectivamente (Pigg et al., 1998; Rodríguez-Pazos et al., 2011). No se han descrito diferencias entre ambos sexos ni variaciones apreciables dependiendo de la raza o condición social. No hay información sobre la prevalencia de esta patología en México.

Las ARCI comparten algunas manifestaciones clínicas como deshidratación neonatal, ectropión, infecciones de piel recurrentes, hipohidrosis con intolerancia grave al calor y eclabium. No existe aún una relación clara genotipo-fenotipo para este grupo de enfermedades y se ha visto que diferentes mutaciones en el mismo gen pueden presentarse con fenotipos distintos dentro de la misma clasificación de ARCI (Oji y Traupe, 2009), lo cual se conoce como heterogeneidad alélica. Inclusive, al paso del tiempo, un fenotipo puede evolucionar a otro. Por ejemplo, individuos con ictiosis arlequín (Figura 3) que sobreviven el período perinatal posteriormente desarrollan eritrodermia severa. O como es el caso de mutaciones de sentido equivocado en *ABCA12* que se manifiestan como bebé colodión y posteriormente desarrollan ictiosis lamelar o eritrodermia ictiosiforme (Figura 4). El hecho de que compartan genes fue la razón por la que se englobaron dentro del término unificador ARCI. A la fecha existen 9 genes asociados a ARCI (Tabla 2, figura 5).



Figura 3. Feto con ictiosis arlequín. (Imagen tomada de Jian et al., 2018).



Figura 4. Recién nacido con eritrodermia ictiosiforme. (Imagen tomada de Murase et al., 2018)

Tabla 2. Genes asociados a ARCI (Fischer, 2009; Thomas et al., 2006).

Tipo de ARCI	Gen(es) asociado(s)
Arlequín	<i>ABCA12</i>
Lamelar	<i>TGM1</i> <i>NIPAL4 (Ictina)</i> <i>ALOX12B</i> <i>ABCA12</i> <i>ALOXE3</i> <i>CYP4F22</i>
Eritrodermia ictiosiforme	<i>ALOXE3</i> <i>ALOX12B</i> <i>ABCA12</i> <i>CYP4F22</i> <i>NIPAL4</i> <i>TGM1</i>
Otros raros	<i>PNPLA1</i> (Grall et al., 2012), <i>CERS3</i> (Radner et al., 2013), <i>LIPN</i> (Shirli Israeli et al., 2011).

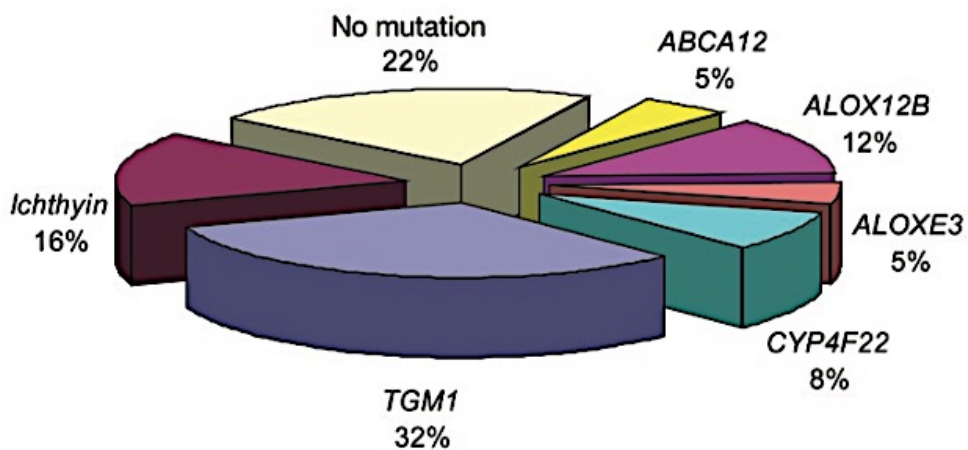


Figura 5. Espectro mutacional en las ARCI considerándolas como grupo (Tomado de Fischer, 2009).

*TGMI* (OMIM 190195, Locus 14q12), es un gen que codifica para la proteína transglutaminasa 1 y tiene 15 exones. Su producto proteico se encuentra principalmente en las capas superiores de la epidermis y funciona como enzima que cataliza un enlace isodipéptido para la formación de la capa protectora queratinizada de la piel (Richard & Bale, 2001). Aproximadamente 30-40% de los pacientes diagnosticados con una ARCI presentan mutaciones en el gen *TGMI*. Se han identificado alrededor de 130 mutaciones distintas en este gen causales de ARCI, la mayoría de las cuales son variantes en una base (Tabla 3). La mayoría de las mutaciones se encuentran en los primeros dos tercios del gen. Una variante frecuente en todas las poblaciones pero especialmente en individuos noruegos es c.877-2>G la cual afecta el sitio aceptor de splicing del intrón 5 (M Hellström Pigg et al., 2014; Pigg et al., 1998). Aproximadamente 40% de todas las mutaciones en *TGMI* suceden en residuos de arginina, en particular en los aminoácidos 142 y 143. Las regiones que codifican para estos aminoácidos contienen islas CpG y se podría deber a desaminación (Farasat et al., 2009; Laiho et al., 1997).



Tabla 3. Espectro mutacional del gen *TGMI* asociado a ictiosis lamelar (Tomado de (M Hellström Pigg et al., 2014; Herman et al., 2009; Laiho et al., 1997; Mazereeuw-Hautier et al., 2009; Russell et al., 1995; Shevchenko, Compton, Toro, DiGiovanna, & Bale, 2000)).

Exón	Variante (cDNA)		
2	c.1-1G>C	4	p.Pro249Leu
2	p.Ser42Tyr	5	p.Trp263X
2	p.Cys53Ser	5	p.Arg264Trp
2	p.Arg54X	5	p.Arg264Gln
2	p.Arg76X	5	c.802delG
2	p.Gly96Asp	5	p.Ser272Pro
2	p.Asp102Val	5	p.Glu265Lys
2	p.Arg106X	5	p.Arg286Gln
3	c.342dupT	5	p.Asn289Thr
3	p.Gln124X	6	c.877-2A>G*
3	c.374delA	6	p.Phe293Val
3	p.Arg126Cys	6	c.882_888del
3	p.Arg126His	6	p.Ile304Phe
3	p.Arg127X	6	p.Arg307Trp
3	p.Tyr134Cys	6	c.932dupC
3	c.408_411dup	6	p.Arg315Cys
3	p.Arg142His*	6	p.Arg323Trp
3	p.Arg142Cys	6	p.Arg323Gln
3	p.Arg142Pro	6	c.984+1G>A
3	p.Arg143Cys	7	p.Asn330His
3	p.Arg143His	7	p.Ser331Pro
3	p.Gly144Arg	7	c.1074delC
3	p.Gly144Glu	7	p.Val359Met
3	p.Ser160Cys	7	p.Tyr365Asp
4	c.566dupG	7	p.Leu366Pro
4	p.Trp193X	7	c.1107dupA
4	p.Leu205Gln	7	p.Val379Leu
4	p.Val209Phe	7	p.Gly382Arg
4	p.Gly218Ser	7	c.1159+G>T
4	p.Arg225His	8	p.Arg389His
4	p.Arg225Pro	8	p.Gly392Asp
4	p.Gln227X	8	p.Arg396Ser
4	p.Leu235X	8	p.Arg396Leu
4	p.Ile243Ser	8	p.Arg396His
		8	p.Phe401Val

8	p.His405Asn
8	c.1223_1227del
8	c.1225_1226del
8	p.Met421Val
8	p.Lys422X
8	p.Asp430Val
8	c.1297delT
9	p.Phe435Val
9	p.Trp436X
9	c.1331dupA
10	p.Gly473Ser
10	c.1420_1421insA
11	p.Tyr504X
11	p.Glu519X
11	p.Tyr544Cys
11	c.1645+1G>A
12	p.Ala560Gly

12	p.Gln582X
12	c.1922_1926+2
13	p.Gln662X
13	p.Ser670X
13	p.2059delC
13	p.Arg687Cys
13	p.Arg689Cys
13	p.Arg689His
13	c.2088+1G>T
14	p.Leu697X
14	c.2114delA
15	c.2226-2A>G
15	p.Arg760X
15	p.Arg764Cys
15	p.Gln774X

*ABCA12* (OMIM 607800, Locus 2q35) es un gen de 53 exones que codifica para el miembro 12 de la subfamilia del cassette de unión a ATP. Su producto es responsable para el transporte dependiente de energía de lípidos epidérmicos y sus enzimas entre organelos especializados llamados cuerpos lamelares. Se han identificado más de 55 mutaciones diferentes para ictiosis arlequín y 5 para ictiosis lamelar en *ABCA12*. Las mutaciones causantes del tipo arlequín son sin sentido o deleciones parciales del gen mientras que mutaciones menos deletéreas como de sentido equivocado causan el tipo lamelar (Richard & Bale, 2001).

*ALOX12B* (OMIM 603741, Locus 17p13.1) contiene 15 exones y codifica para la araquidonato 12-lipoxigenasa tipo 12R que cataliza la conversión de ácido araquidónico a ácido hidroxieicosatetraenoico- 12R. Su función es crucial para la formación de la barrera lipídica de la epidermis (Eckl et al., 2005). La mayoría de las mutaciones encontradas son de sentido equivocado y se presentan sobre todo en el subtipo bebé colodión (Eckl et al., 2005).

*ALOXE3* (OMIM 607206, Locus 17p13.1) codifica para la araquidonato lipooxigenasa tipo 3 y se encuentra en un grupo de genes que codifican para lipooxigenasas en el cual

se encuentra también *ALOX12B*. Su producto proteico es una enzima encargada de generar ácidos grasos en conjunto con *ALOX12B* para formar la barrera lipídica de la piel (Krieg, Marks, & Fürstenberger, 2001).

*NIPAL4* (OMIM 609383, Locus 5q33.3) tiene 6 exones y codifica para un transportador de magnesio también llamado “ictina” cuya función específica es desconocida. Hay dos mutaciones de sentido equivocado (p.Ala176Asp y p.Gly230Arg) que son responsables de 90% de los casos y se asocian a un fenotipo de eritrodermia leve a moderada (Dahlqvist et al., 2007).

*CYP4F22* (OMIM 611495, Locus 19p.13.12) contiene 12 exones y codifica para el miembro 22 del citocromo P450 de la familia 4 subfamilia F. Se le atribuye un papel en la vía de la lipooxigenasa 12R involucrada en el metabolismo de ácido araquidónico y síntesis de eicosanoides (Richard & Bale, 2001).

*PNPLA1* (OMIM 612121, Locus 6p21.31) codifica para un miembro de la familia de fosfolipasas similares a patatina. Esta proteína se encuentra en el citoplasma y asociado al citoesqueleto y se cree que posee propiedades para la organización de lípidos y el metabolismo de la barrera epidérmica. Se han identificado diversas mutaciones sin sentido y de sentido equivocado en sujetos afectados (Grall et al., 2012).

*CERS3* (OMIM 615276, Locus 15q26.3) codifica para la sintasa de ceramida tipo 3 y mutaciones en este gen están reportadas en dos familias con el tipo bebé colodión con ectropión y eclabium (Eckl et al., 2005; Radner et al., 2013).

*LIPN* (OMIM 613924, Locus 10q23.31) codifica para el miembro N de la familia lipasa que se expresa en queratinocitos principalmente durante la diferenciación epidérmica. Una delección de dos pares de bases se reportó en una familia árabe consanguínea con ictiosis lamelar de inicio tardío (Shirli Israeli et al., 2011).

### 2.2.2 Ictiosis lamelar (IL)

La ictiosis lamelar es una de las formas de menor prevalencia y mayor gravedad de ictiosis congénita, estando presente desde el nacimiento y persistiendo durante toda la vida. Los niños nacen habitualmente prematuros, con una piel eritematosa (rojiza), y una membrana dura y translúcida, que los envuelve por completo, denominada membrana colodión. La mayoría de los pacientes (>90%) nacen como bebé colodión (BC), forma en la que se presentan también otros tipos de ictiosis, aunque con menos frecuencia que en la ictiosis lamelar (Oji et al., 2010) (Figuras 6 y 7). Durante las primeras semanas de vida, esta envoltura superficial tiende a secarse y a agrietarse, y es gradualmente reemplazada por grandes láminas y escamas individuales de color generalmente oscuro (Figura 8). Esta envoltura puede causar dificultad respiratoria por constricción torácica y abdominal; además las pérdidas transepidermicas de agua y el riesgo de infección y deshidratación son muy elevadas (Larrègue, Ottavy, Bressieux, & Lorette, 1986).

Es habitual que exista en los fenotipos más graves ectropión y eclabium; alopecia cicatricial, especialmente en la periferia del cuero cabelludo; hipoplasia de los cartílagos auriculares y nasales; y queratodermia palmar y plantar. El ectropión es la eversión de los párpados superiores e inferiores; el eclabium es la eversión de los labios. Posterior a la etapa neonatal, el eclabium desaparece independientemente del uso de medicamentos. El ectropión, sin embargo, no corrige de manera espontánea y causa lagofthalmos con exposición corneal consecuente, ulceración corneal y en casos graves perforación y ptosis bulbi (Turgut et al., 2009). Los pacientes sufren de ojo seco evaporativo a lo largo de su vida por disfunción en las glándulas de Meibomio (Palamar, Karaca, Onay, Ertam, & Yagci, 2018).

Los genes más frecuentemente mutados en IL son *TGMI*, *ALOXE3*, *NIPAL4*, *CYP4F22* y *ALOX12B*. Gracias a diversos estudios poblacionales realizados a nivel mundial sabemos que la frecuencia con la que *TGMI* se asocia a un fenotipo IL es del 74-85% (Hellström Pigg et al., 2016; Israeli et al., 2013; Rodríguez-Pazos et al., 2011).



**Figura 6.** Bebé colodión caracterizado por una capa brillante blanquecina que tiende a fisurarse con el tiempo. En el caso de la ictiosis lamelar, esta capa se torna café oscuro (Tomada de Schmuth et al., 2012)).



**Figura 7.** Bebé colodión con eclabium y ectropión en la etapa neonatal (Tomada de Oji et al., 2010).



**Figura 8.** Escamas grandes y oscuras en un paciente con mutación en *TGMI* (Tomada de Schmuth et al., 2012).

## 2.3 Caracterización de mutaciones causales en enfermedades monogénicas

En la actualidad, la identificación de la alteración genética que causa una enfermedad monogénica se realiza, en general, a través de dos procedimientos: secuenciación nucleotídica tipo Sanger para enfermedades asociadas a solo uno o pocos genes o secuenciación de siguiente generación (NGS) para enfermedades con heterogeneidad genética.

### 2.3.1 Secuenciación Sanger

La secuenciación nucleotídica automatizada tipo Sanger es el estándar de oro para detectar variantes en el genoma. El fundamento de la técnica es la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En la PCR se usan oligonucleótidos sentido y antisentido diseñados específicamente para que flanqueen una región del genoma de interés. Se usan reactivos para realizar la replicación del DNA *in vitro* como son una polimerasa de DNA, desoxiribonucleótidos (adenosina trifosfato, citidina trifosfato, timidina trifosfato y guanosa trifosfato), magnesio y agua. En el caso de la reacción de secuenciación Sanger se usan además didesoxiribonucleótidos marcados con un fluoróforo diferente cada uno. Los didesoxinucleótidos impiden que la reacción de amplificación continúe en el momento en que se agrega uno a la cadena de DNA creciente. De esta forma, al finalizar la reacción de secuenciación se obtienen miles de cadenas de tamaños distintos cada una con un nucleótido marcado con un fluoróforo al final. El secuenciador es el instrumento que se utiliza para detectar cada fluoróforo y la posición en la que se encuentra (Sanger et al, 1977).

Ciertas condiciones se tienen que cumplir para poder hacer diagnóstico molecular con la técnica de Sanger, la principal y más limitante en el ámbito clínico es el conocimiento previo del gen que se va a estudiar. Para enfermedades genéticamente heterogéneas, como la ictiosis lamelar, se torna sumamente complejo seleccionar el gen que se va a estudiar y el rendimiento diagnóstico es bajo (Neveling et al., 2013). Otras limitantes importantes son el tiempo que se requiere para estudiar múltiples genes completos, la cantidad de DNA necesaria que es mayor a otras técnicas y el costo de estudiar múltiples genes (Lohmann & Klein, 2014).

### 2.3.2 Secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés)

La secuenciación de nueva generación permite el análisis simultáneo de múltiples regiones del genoma de un individuo y ofrece una alternativa eficiente para el diagnóstico molecular de enfermedades con heterogeneidad genética como las ictiosis congénitas autosómicas recesivas. Estas nuevas tecnologías de secuenciación de DNA permiten el análisis de millones de nucleótidos en una corrida única, abaratando los costos y proporcionando una cantidad extraordinaria de datos (Figura 9). El rendimiento diagnóstico con NGS en comparación con secuenciación tipo Sanger es 50% mayor (Neveling et al., 2013). Existen múltiples casos reportados en la literatura en donde se demuestra la utilidad de NGS para el diagnóstico de ictiosis congénita (Akbari & Ataei-Kachoui, 2015; Gupta et al., 2015; M Hellström Pigg et al., 2014).

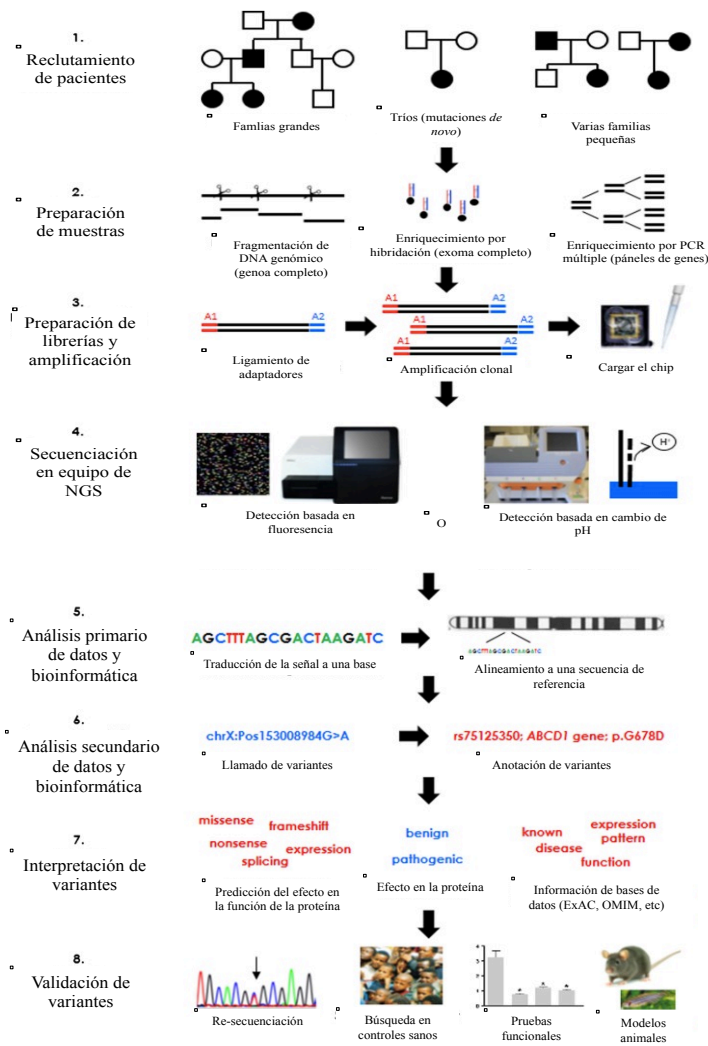


Figura 9. Esquema general y resumido de los pasos requeridos para la identificación de una mutación causal mediante NGS (Imagen modificada de (Lohmann & Klein, 2014).

### **3. Planteamiento del problema**

En México existen poblaciones con aislamiento reproductivo lo cual favorece la presencia de enfermedades autosómicas recesivas. Un ejemplo es Pajapan, Veracruz en donde existe una frecuencia alta de ictiosis lamelar. En ocasiones estas enfermedades pueden tener como origen una mutación fundadora lo cual tiene implicaciones para el diagnóstico y la aparición de nuevos casos. En Pajapan no se conoce la prevalencia de la enfermedad, la causa genética, ni la frecuencia de portadores.

### **4. Pregunta de investigación**

¿La alta frecuencia de ictiosis lamelar en Pajapan, Veracruz es debida a una mutación fundadora?



## 5. Justificación

La ictiosis lamelar es una enfermedad de origen genético y la identificación de la mutación causal contribuirá al conocimiento de sus características moleculares en la población referida. Así mismo, la identificación de la causa genética permitirá la detección de portadores lo cual es fundamental para el consejo genético.

## 6. Objetivos

- Objetivo general:
  - Determinar si los casos de ictiosis lamelar en Pajapan, Veracruz son consecuencia de una mutación fundadora.
- Objetivos específicos:
  - Determinar la prevalencia de enfermos con IL en Pajapan.
  - Identificar la mutación causal de los pacientes con IL.
  - Estimar la prevalencia de portadores de la mutación en la población.

## 7. Metodología

Estudio observacional, transversal, analítico, realizado en tres fases.

### 7.1 Fase 1- Identificación de Personas con Ictiosis Lamelar

Se usó un muestreo no probabilístico de tipo “bola de nieve” en la que los individuos seleccionados para ser estudiados reclutan a nuevos participantes entre sus conocidos. La Fundación Yanavi, A.C. quien apoya a los pacientes con ictiosis de Pajapan reclutó a los pacientes para participar en el estudio.

Se realizó historia clínica genética (Anexo 1) y exploración física de los afectados. Se obtuvo la firma del consentimiento informado (Anexo 2) y toma de muestra de mucosa oral en todos los individuos afectados.

Para la toma muestra de mucosa oral se requirió un ayuno de los pacientes. Se rasparon los carrillos con un cepillo colector y se colocó el cepillo en un tubo de 1.5 ml con 200 microlitros de buffer de lisis celular.

#### *Criterios de Inclusión*

- Ser paciente con IL, habitante del municipio de Pajapan, Veracruz y antecedente de por lo menos de un abuelo de cada rama (materna y paterna) originario de Pajapan, Veracruz.
- Aceptar participar en el estudio.

La prevalencia de individuos con IL se calculó con base en la población calculada de Pajapan, Veracruz (INEGI. Censo de Población y Vivienda, 2010).

### 7.2 Fase 2- Identificación de las Mutaciones Causales.

Todos los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana a excepción de la secuenciación de exoma completo.

### *Aislamiento de DNA Genómico*

El DNA genómico de cada sujeto participante se aisló a partir de células de mucosa bucal obtenidas por raspado con cepillo y utilizando el kit Gentra Puregene Buccal Cell (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se incubó a 65°C por 1 hr el tubo de 1.5 ml con 200 microlitros de buffer de lisis celular conteniendo el cepillo con el que fue tomada la muestra. Después de la incubación se agregaron 1.5 microlitros de Proteinasa K, se invirtió el tubo 25 veces y se incubó a 55°C durante 1-3 horas. Posteriormente, se retiró el cepillo colector del tubo cuidando de remover el mayor líquido posible del cepillo. Se le adicionaron 100 microlitros de Solución de Precipitación de Proteínas y se agitó en vortex por 20 segundos a máxima velocidad. Acto seguido, el tubo se incubó en hielo por 5 minutos. Después, se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm y se colocó cuidadosamente por inversión el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 ml con una solución de 300 microlitros de isopropanol y 0.5 microlitros de glicógeno. Se mezcló invirtiendo el tubo 50 veces y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó en papel absorbente con cuidado de no perder el botón. Se adicionaron 300 microlitros de etanol al 70%, se invirtió varias veces para lavar el DNA y se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue desechado al invertir el tubo sobre papel absorbente con cuidado de no perder el botón y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos; se adicionaron 100 microlitros de agua para hidratar el DNA, se agitó en vortex por 5 segundos y se incubó a 65°C por una hora. Se incubó a temperatura ambiente toda la noche en agitación suave. Finalmente, el tubo con el DNA fue guardado a -20°C hasta su utilización. La calidad y concentración del DNA obtenido fue verificada con el equipo de espectrometría Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, EEUU). La absorbancia a  $\lambda 260/280$  indica la concentración libre de proteínas y solventes orgánicos y un rango de 1.8-2.2 se consideró aceptable.  $\lambda 260/230$  indica concentración de lípidos y carbohidratos y un rango de 2.2-2.5 se considera aceptable.

### *Secuenciación De Exoma Completo*

Debido a la heterogeneidad genética asociada a la IL, se decidió como abordaje inicial realizar NGS para la identificación rápida y eficaz de la mutación causal. El estudio se hizo en DNA de un paciente (ID 3372) con IL de otra población de Veracruz (Alvarado) ya que al momento era el material genético que se tenía disponible. La secuenciación de exoma completo de este caso se realizó en un servicio comercial (Centrillion Biosciences, Palo Alto,

EEUU). Brevemente, el DNA genómico del individuo se enriqueció mediante hibridación siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se crearon librerías y se amplificaron las mismas; para este paso es necesario agregar adaptadores en los extremos 5' y 3' de las librerías para que se puedan identificar y posteriormente someterlas a un amplificación clonal. Las librerías se cargaron en chips o cartuchos preparados por el fabricante y finalmente se utilizó un secuenciador especializado para NGS (Figura 9 pasos 1-4).

Para el análisis de datos se utilizó la plataforma en línea Galaxy Server. Los datos de secuenciación se leyeron y mapearon utilizando el algoritmo Burrows-Wheeler Aligner (BWA)-MEM. VarScan 2.3.6 se utilizó para el llamado de variantes. Se utilizó la versión del genoma humano GRCh37 (hg19) como referencia para el mapeo y el llamado de variantes. Dos archivos VCF se generaron por cada muestra, uno para SNVs (single nucleotide variants) y otro para INDELS (insertions-deletions). Cada archivo VCF se revisó y se filtró con el software Illumina VariantStudio 3.0. Se filtraron variantes con una cobertura menor a <30x y aquellas con una frecuencia alélica menor por encima de 0.05 en las bases de datos dbSNP, 1000genomes, Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project) y Exome Aggregation Consortium (ExAC). Una vez descartando que se tratara de un polimorfismo se utilizaron tres algoritmos de análisis de patogenicidad *in silico*: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) (I. A. Adzhubei et al., 2010), SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (Kumar, Henikoff, & Ng, 2009) y Mutation Taster (Schwarz, Cooper, Schuelke, & Seelow, 2014) (Figura 9 pasos 5-8). Se utilizaron los criterios del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y Asociación de Patología Molecular (ACMG, por sus siglas en inglés) (Richards et al., 2015) para determinar la patogenicidad de la variante.

#### *Secuenciación Sanger del Gen TGMI*

Se utilizó la técnica de secuenciación nucleotídica Sanger para secuenciar el gen *TGMI*. Se utilizó el programa PrimerQuest® (IDT, Coralville, EEUU) para diseñar oligonucleótidos específicos para los exones de interés del gen *TGMI* (Tabla 4).

Primero, se realizó una reacción de amplificación por PCR (secuenciación en cadena de polimerasa) para cada exón. Cada reacción tuvo un volumen final de 15 microlitros que consistió en 6.0 microlitros de KAPA2G Fast PCR kit (Merck, Darmstadt, Alemania) 100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 0.3 microlitros de oligonucleótidos forward

(sentido) y reverse (antisentido) cada uno a una concentración de 10nM, y se aforó con agua bidestilada a 15 microlitros. Se utilizaron termocicladores para llevar a cabo la reacción de amplificación con el programa de temperaturas de 1 ciclo de 3 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 38 ciclos de 15 segundos de desnaturalización, 15 segundos de alineamiento según la temperatura indicada para cada exón, 15 segundos a 72°C para la extensión y al final 1 ciclo a 72°C por 3 minutos para la extensión final.

Los productos de las reacciones de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% tiñendo cada amplificado con 2 microlitros de SYBR Green (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) y usando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases. Se reconocieron las bandas de interés y se cortaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen). Se realizaron nuevas reacciones de PCR para cada uno de los amplificados. Cada reacción tuvo un volumen final de 10 microlitros que consistió en .3 microlitros de la enzima BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), 3.5 microlitros de buffer 5X, 10-20 nanogramos de DNA de cada producto de amplificación del la PCR anterior, .5 microlitros de oligonucleótido a 10 nM y agua bidestilada para un volumen final de 10 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyeron 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas de Sephadex (GE Healthcare, Chicago, EEUU) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente la muestra se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Inmediatamente después de la desnaturalización las muestras se pasaron a incubar en hielo durante mínimo tres minutos. Las secuencias se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) y revisaron manualmente comparando con la secuencia silvestre del gen.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos dirigidos a exones del gen *TGMI*, temperatura de alineamiento específica y tamaño esperado del amplificado.

<b>EXON</b>	<b>SECUENCIA DE OLIGONUCLÉOTIDOS</b>	<b>TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (°C)</b>	<b>TAMAÑO DE AMPLIFICADO (pb)</b>
Exón 2	F: CTGTCTGGATGGAGGGTTTC R: CCCAGGCCCTTATCATTAGC	56.6	506
Exón 3	F: GAGACTCAGCCTGGCATTTC R: AACTTGCACCTGCCTTATC	56	420
Exón 4	F: GGACATACACAGTGGCTCATAC R: GAAGCCCTTCCCTGTCTTTC	57.6	419
Exón 5	F: CTCCACCATCTGTCATGCTC R: CAGCACCTGCTCCAATAC	56.6	368
Exón 6	F: AGGGTCACATACACCCAGA R: GAATCCAGAAAGGGCAGGAG	56	306
Exón 7	F: CTGGATCCTGAGGCATTTAGG R: TTCCTCCCTTCTCCCTGTAG	57	357
Exón 8	F: CAATCCTAGTTGCCCTTCTC R: GGTCAGGAGTCCTCAGTT	54	341
Exón 9	F: GCCCATCTGTGCTGAAGAAT R: GGTTACATGGCTTGGCTCTC	56	343
Exón 10	F: CTGATGACCTTGTTCCAGAGG R: GAAGTTGGGACCAGAGAACC	57	294
Exón 11	F: CAAGCCCTGTCCCATAGC R: AAGGGTGAGGTTCCAATTCC	55.4	352
Exón 12	F: GGAGGACATCACCTACCTCTA R: CTTCCCTACATGAGGCTTCC	57.1	541
Exón 13	F: GGAAGCCTCATGTAGGGAAG R: CCCACCTCTGATGTCCTTATC	57.1	288
Exón 14	F: CAGGAGGATAAATGTGGGACTC R: CTAAAGGCTGGTGGGACTG	56	442
Exón 15	F: CTGCTTCTTCCCTCCTGACTG R: GGAGCTGCTCTGTAGTGTG	57.1	401

F: forward (sentido) R: reverse (antisentido) pb: pares de bases

### 7.3 Fase 3- Determinación de frecuencia de portadores en Pajapan, Veracruz

Fase de estudio transversal.

Primero se calculó el tamaño de muestra necesario para obtener una muestra representativa de la población de Pajapan.

#### *Tamaño de muestra*

El municipio de Pajapan, Veracruz tiene una población de 8,434 habitantes (Clave INEGI 301220001, 2010). Para obtener el tamaño de muestra se utilizará la fórmula de poblaciones finitas en donde:

$$n = \frac{Z^2 P Q N}{(N - 1) E^2 + Z^2 P Q}$$

n= tamaño de muestra

Z= 1.96

P= .5

Q=.5

N=8434

E=.05

Se obtuvo un valor de 371 sujetos sanos necesarios para establecer la frecuencia de portadores.

#### *Muestreo*

Se realizó un muestreo aleatorio simple sobre las Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEBs) actualizadas del Estado de Veracruz/Pajapan/Pajapan (SINCE/INEGI, 2010). Se utilizaron las AGEBs ya que son la base del marco muestral nacional oficial y permiten realizar un muestreo objetivo además de facilitar el ejercicio de muestreo sobre una base geoestadística validada (INEGI, 2010). El muestreo se realizó en el total de viviendas del cálculo de la muestra, se aplicó el instrumento de recolección (Anexo 3) previo firma de consentimiento informado y la toma de muestra de mucosa oral del padre, madre de familia o habitante mayor de edad.

### *Criterios de Inclusión*

- Ser habitante de la manzana de Pajapan, Veracruz seleccionada por el muestreo aleatorio y no tener IL.
- Aceptar participar en el estudio.
- Ser mayor de edad.

Las muestras de mucosa oral se utilizaron para aislar DNA genómico y posteriormente analizar por secuenciación Sanger (como se describió previamente) solamente el exón con la mutación causal identificada.

La prevalencia de portadores se calculó con base en la población estimada de Pajapan, Veracruz (INEGI. Censo de Población y Vivienda, 2010).

### *Análisis de datos*

Una vez finalizada la etapa de recolección de muestras y secuenciación de las misma, se utilizó el software OpenEpi versión 3.01 (<https://www.openepi.com>) para calcular el poder del estudio.

### **Variables del estudio**

<b>Variable</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Unidad de Medición</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>
<b>Prevalencia de enfermos</b>	Cuantitativa continua	Tasa (por 1000 habitantes)	Proporción de individuos con una enfermedad en una población en un momento dado	Número de individuos con IL en Pajapan entre la constante poblacional
<b>Mutación causal</b>	Cualitativa nominal	Presente/Ausente	Variante en la secuencia de nucleótidos que causa una enfermedad	Variante en un gen de IL comprobada por secuenciación Sanger que cumple con criterios de patogenicidad del ACMG.
<b>Prevalencia de portadores</b>	Cuantitativa continua	Tasa (por 1000 habitantes)	Proporción de individuos sanos que son portadores de una enfermedad autosómica recesiva en una población en un momento dado	Número de individuos de Pajapan con mutaciones monoalélicas en un gen de IL entre la constante poblacional



## 8. Resultados

### 8.1 Resultados de la Fase 1- Identificación de Pacientes Enfermos con IL en Pajapan

Se identificaron 9 pacientes en 5 familias con IL en Pajapan, Veracruz. Todos ellos presentaron el fenotipo típico de IL con escamas café oscuras distribuidas en todo el cuerpo y ectropión. La IL fue detectada al nacimiento en todos ellos y ninguno presentó datos atípicos de la enfermedad. El análisis de los árboles genealógicos apoyó una transmisión autosómica recesiva en todas las familias.

Se encontraron más mujeres afectadas (6/9, 67%) que hombres (3/9, 33%).

Los pacientes se encuentran entre los 12 meses y 27 años de edad (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de los casos de IL de acuerdo a su grupo etario.

<b>Grupo etario</b>	<b>Número de pacientes</b>
<b>Menor de 1 año</b>	0
<b>1-4 años</b>	1
<b>5-14 años</b>	4
<b>15-24 años</b>	3
<b>25-44 años</b>	1
<b>Mayor de 45 años</b>	0

*Familia 1*

Paciente 1.0 (Propósita)- Femenino de 1 año de edad, hija de padres jóvenes, no consanguíneos (Figura 10a). Padres originarios de Jicacal, Pajapan, Veracruz. Niegan presencia de eclabium al nacimiento. Presenta ectropion, lesiones típicas de ictiosis generalizadas y lagofthalmos (Figura 10b).

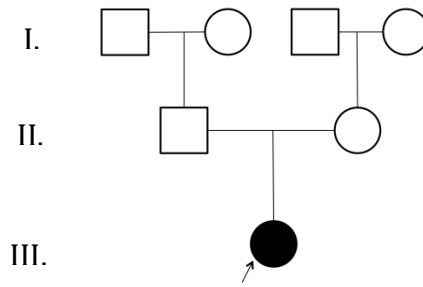


Figura 10a. Árbol genealógico de la familia 1 con la paciente propósita (ID 1.0) señalada con flecha.



Figura 10b. Fotografía de la paciente 1.0 al año de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas cafés. También es evidente la ausencia de cejas.

## Familia 2

Paciente 2.0 (Propósito)- Masculino de 6 años, hijo de padres jóvenes, no consanguíneos (Figura 11a). Padres originarios de Pajapan. Presentó ectropion, lesiones típicas en piel generalizadas y lagoftalmos (Figura 11b).

Paciente 2.1- Femenino de 27 años, hija de padres no consanguíneos. Padres originarios de Pajapan. Desconoce si presentó eclabium al nacimiento, actualmente con ectropion, ictiosis generalizada y lagoftalmos (Figura 11c). Prima hermana de paciente 2.0.

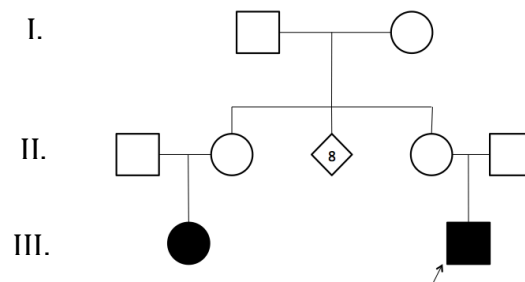


Figura 11a. Árbol genealógico de la familia 2 con el paciente propósito (ID 2.0) señalado con flecha.



Figura 11b. Fotografía del paciente 2.0 a los 6 años de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas café.



Figura 11c. Fotografía de la paciente 2.1 a los 27 años de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas cafés. La paciente también presenta alopecia imoportante en las regiones parietal y temporal.

### *Familia 3*

Paciente 3.0 (Propósito)- Masculino de 16 años, hijo de padres no consanguíneos (Figura 12a). Padres originarios de Pajapan. Presentó ectropion desde el nacimiento y lesiones típicas (Figura 12b).

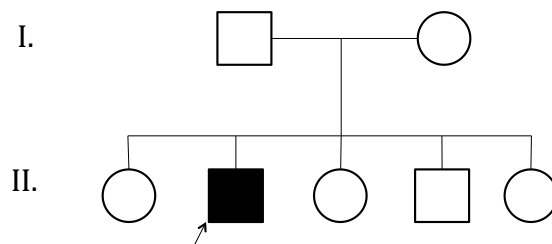


Figura 12a. Árbol genealógico de la familia 3 con el paciente propósito (ID 3.0) señalado con flecha.



Figura 12b. Fotografía del paciente 3.0 a los 16 años de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas cafés.

#### *Familia 4*

Paciente 4.0 (Propósita)- Femenino de 17 años, hija de padres no consanguíneos y originarios de Pajapan (Figura 13a). Presenta ectropion e ictiosis generalizada (Figura 13b).

Paciente 4.1- Femenino de 5 años, hija de padres no consanguíneos y originarios de Pajapan. Sobrina de la paciente 4.0. Presentó ectropion y piel en celofán al nacimiento. Actualmente con ictiosis lamelar generalizada, ectropion y lagofthalmos (Figura 13c).

Paciente 4.4- Femenino de 5 años hija de padres no consanguíneos y originarios de Pajapan. Presentó ectropion, eclabium y piel en celofán al nacimiento. Actualmente con IL generalizada, ectropion y lagofthalmos. Como antecedente heredofamiliar, refirieron tres medio tíos paternos finados durante la infancia por causas desconocidas con descripción fenotípica de IL.

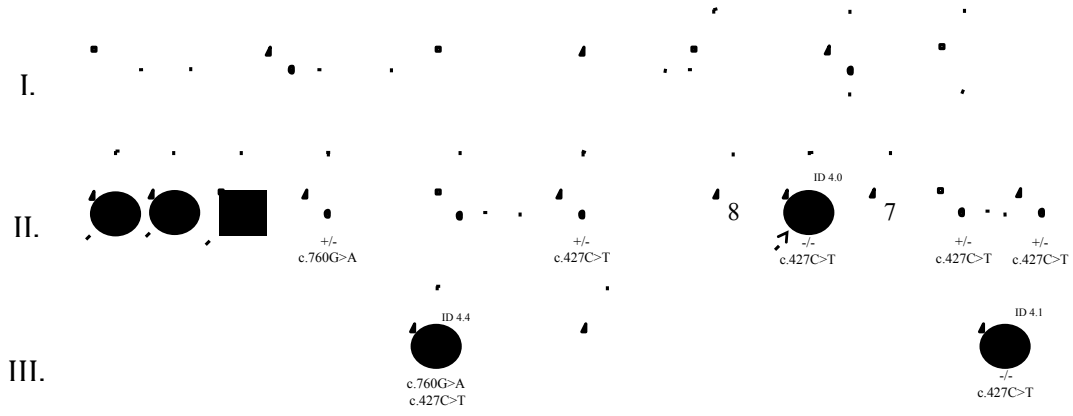


Figura 13a. Árbol genealógico de la familia 4 con la paciente propósita (ID 4.0) señalada con flecha.



Figura 13b. Fotografía de la paciente 4.0 a los 17 años de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas cafés.



Figura 13c. Fotografía del paciente 4.1 a los 5 años de edad en donde se evidencia el ectropion y las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas cafés. La paciente también presenta alopecia frontal.

#### *Familia 5*

Paciente 5.0 (Propósita)- Femenino de 17 años, hija de padres no consanguíneos, originarios de Pajapan (Figura 14a). Presentó eclabium, ectropion y piel en papel celofán al nacimiento. Actualmente con ectropion, IL generalizada y lagofthalmos.

Paciente 5.1- Masculino de 11 años, hermano de la paciente 5.0. Presentó eclabium, ectropion y piel en papel celofán al nacimiento. Actualmente con IL generalizada, ectropion y lagofthalmos (Figura 14b).

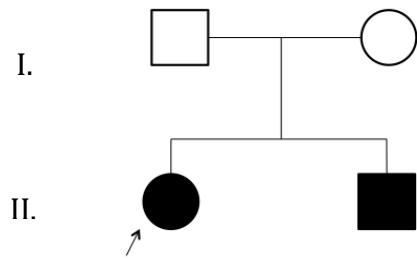


Figura 14a. Árbol genealógico de la familia 5 con la paciente propósita (ID 5.0) señalada con flecha.



Figura 14b. Fotografía del paciente 5.1 a los 11 años de edad en donde se evidencia el ectropion, las lesiones en piel que se caracterizan por se escamas café y lagofthalmos bilateral.



## Cálculo de Prevalencia de IL en Pajapan

De acuerdo al número de casos identificados con IL y sobre la base poblacional, se obtuvo una prevalencia de 1.07 casos por cada 1,000 habitantes (1/935 habitantes).

## 8.2 Resultados de la Fase 2- Identificación de variante patogénica causal

En el estudio de secuenciación de exoma completo del paciente ID 3372 con IL se identificó una variante patogénica en el gen *TGMI*, c.1159+1G>T, en estado homocigoto (Figura 15). La variante es patogénica y recurrente (Herman et al., 2009). Teniendo esta primera variante, se decidió buscar la misma en los pacientes de Pajapan por secuenciación Sanger. El resultado de los 9 pacientes para esta variante fue negativo.

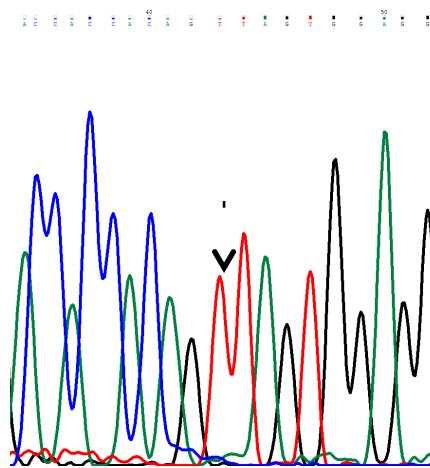


Figura 15. Electroferograma parcial de la secuenciación Sanger del exón 7 del paciente 3372 en donde se evidencia (flecha) el cambio homocigoto c.1159+1G>T.

Al tener un resultado negativo se decidió secuenciar el gen *TGMI* completo de uno de los pacientes de Pajapan, la paciente 4.0. En ella se encontró la variante patogénica y recurrente en el exón 3, c.427C>T (Laiho et al., 1997) en estado homocigoto (Figura 16B). Posteriormente, se buscó esta misma variante en el resto de los pacientes de Pajapan. Se encontró en estado homocigoto en 6 de los pacientes (1.0, 2.0, 2.1, 4.1, 5.0 y 5.1). En la paciente 4.4 la variante se encontró en estado heterocigoto (Figura 16C).

En el paciente 3.0 se encontró en estado homocigoto para el alelo silvestre por lo que se decidió secuenciar el resto de los exones del gen *TGMI*. Se identificó la variante patogénica y recurrente (Cao X, et al., 2009), c.760G>A, en el exón 5 en estado homocigoto (Figura 17A). Esta misma se buscó directamente en la paciente 4.4 y se encontró en estado heterocigoto; por

lo tanto, la paciente 4.4 es heterocigoto compuesto (Figura 17B). Las variantes patogénicas identificadas se resumen en la tabla 6.

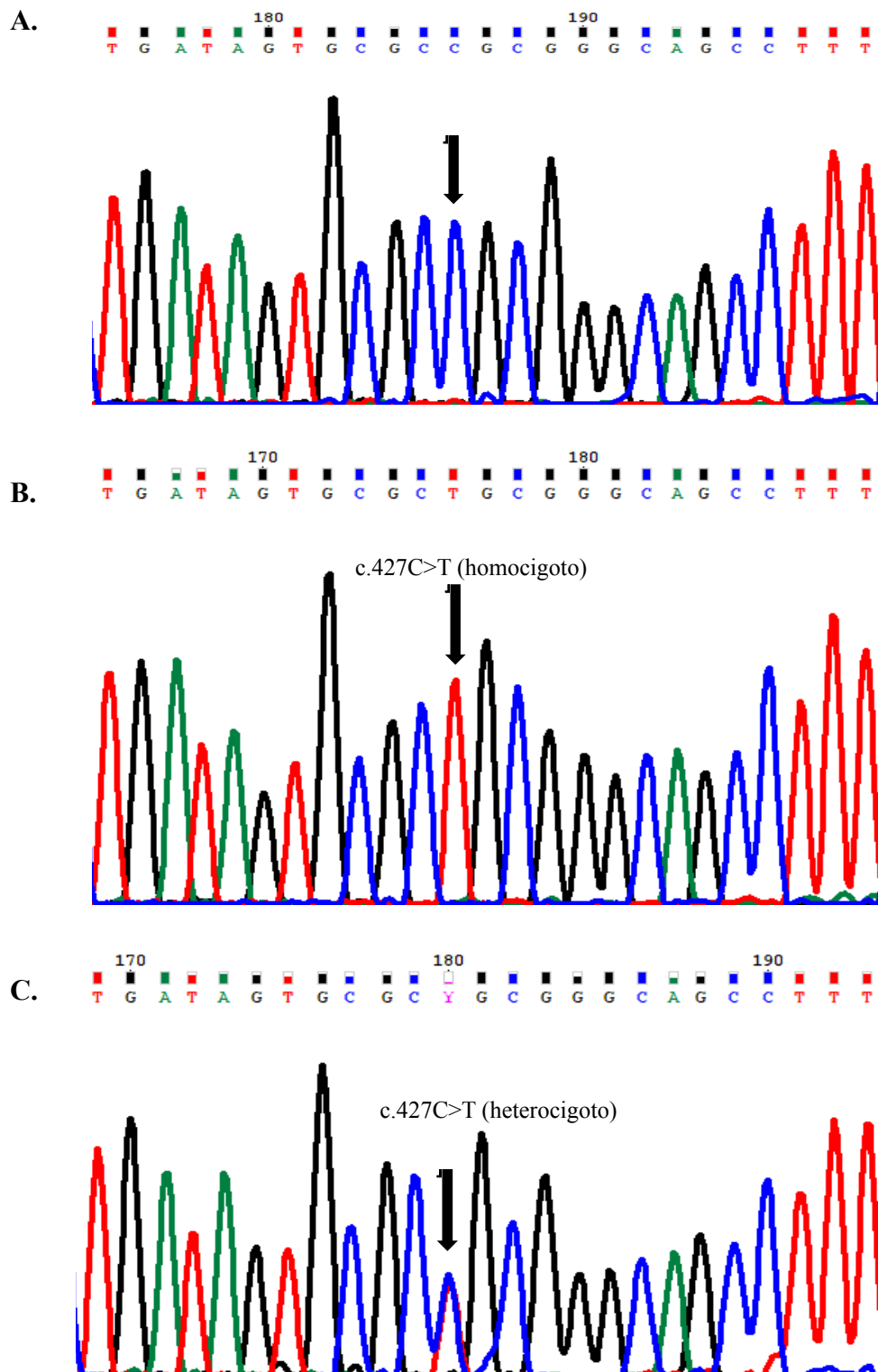


Figura 16. Electroferogramas parciales del exón 3 del gen *TGMI*. A. Secuencia de un individuo con homocigoto para el alelo silvestre. La posición de interés c.427 se señala con una flecha negra. B. Secuencia de la paciente 4.0 en donde se observa la variante c.427C>T en estado homocigoto. C. Secuencia de la paciente 4.4 en donde se observa la variante c.427C>T pero en estado heterocigoto.

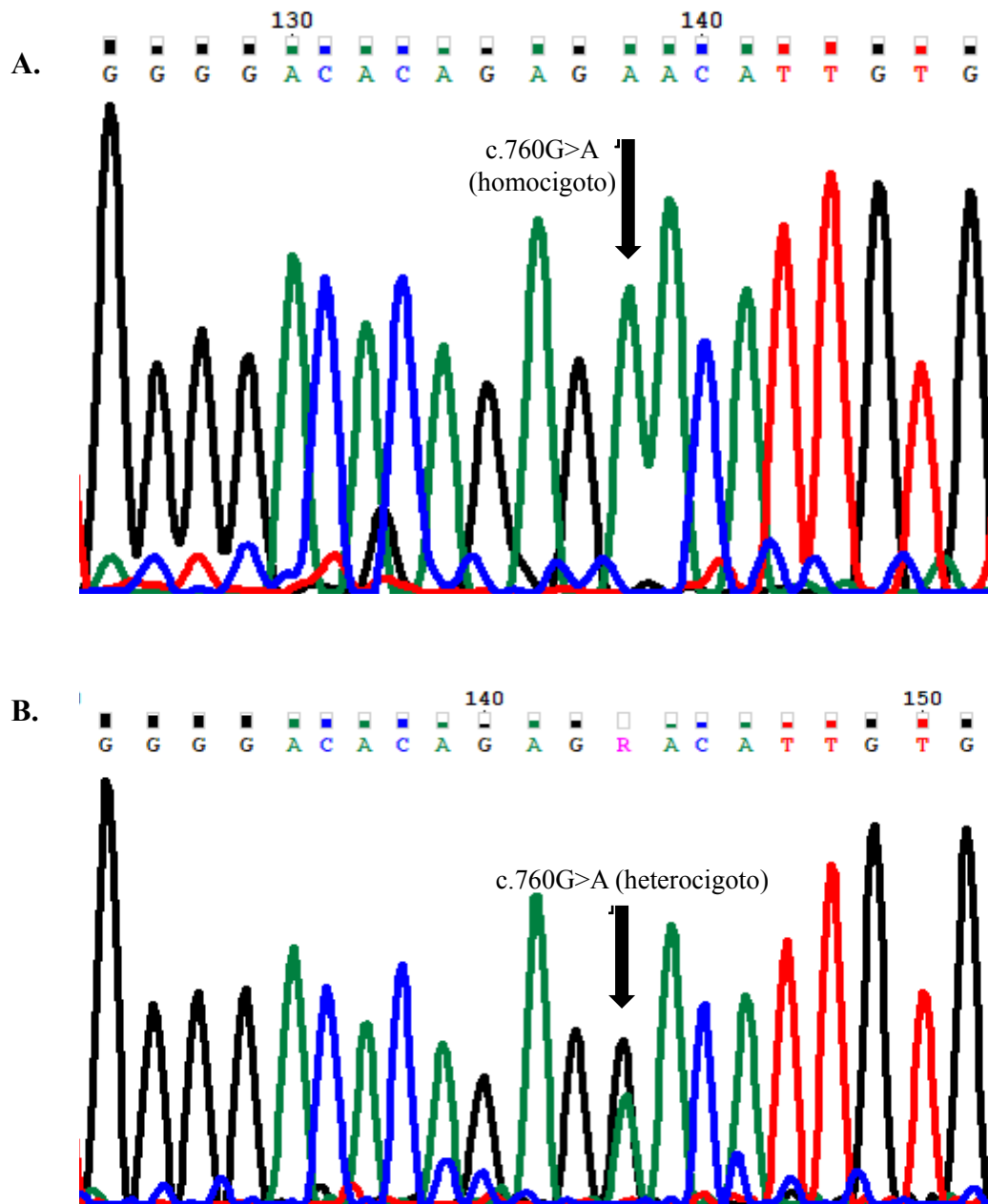


Figura 17. Electroferogramas parciales del exón 5 del gen *TGMI*. A. Secuencia del paciente 3.0 en donde se observa la variante c.760G>A en estado homocigoto (señalada con flecha negra). B. Secuencia de la paciente 4.4 en donde se observa la variante c.760G>A en estado heterocigoto.

**Tabla 6. Variantes patogénicas encontradas en nueve pacientes con IL de Pajapan.**

Paciente ID	Gen	Genotipo	Variante	Cambio de AA	PolyPhen	SIFT	Mutation Taser
1.0,2.0, 2.1, 4.0, 4.1, 5.0, 5.1	<i>TGMI</i> Exón 3	Hom.	c.427C>T	p.Arg143Cys	Probablemente dañina	Dañina	Causante de enfermedad
4.4	<i>TGMI</i> Exón 3	Het.	c.427C>T	p.Arg143Cys	Probablemente dañina	Dañina	Causante de enfermedad
4.4	<i>TGMI</i> Exón 5	Het.	c.760G>A	p.Asp254Asn	Probablemente dañina	Dañina	Causante de enfermedad
3.0	<i>TGMI</i> Exón 5	Hom.	c.760G>A	p.Asp254Asn	Probablemente dañina	Dañina	Causante de enfermedad

AA- aminoácido      Hom- homocigoto      Het- heterocigoto      SIFT- Sorting Intolerant From Tolerant

### 8.3 Resultados de la Fase 3- Identificación de Portadores de la variante c.427C>T en Pajapan

Para la identificación de la frecuencia de portadores y de acuerdo al muestreo establecido, se realizaron 294 entrevistas y tomas de muestras de células de mucosa oral para extracción de DNA.

Después del análisis por secuencia directa de 294 muestras, se identificaron un total de 23 sujetos heterocigotos para la mutación c.427C>T de *TGMI*. Estos resultados permiten estimar una prevalencia aproximada de 78 portadores por cada 1000 habitantes en Pajapan, Veracruz.

De acuerdo a estos datos la frecuencia genotípica fue la siguiente:

C/C =92.2% (homocigotos normales)

C/T= 7.8% (IC 95% 5.14-11.3)\* (heterocigotos)

\*Prueba utilizada Mid-P Exact con la calculadora gratuita en línea OpenEpi ([www.openepi.com](http://www.openepi.com)).

De acuerdo a estas frecuencias genotípicas, se calcula una probabilidad de encontrar un heterocigoto cada 12.8 personas y la probabilidad simple de que dos portadores constituyan una pareja reproductiva es de .61%, es decir, 1 de cada 164 empates.



como el porcentaje de casos positivos en la población muestreada. De acuerdo al modelo de aproximación de continuidad el poder del estudio es de 96.2%.

### Power for Cross-Sectional Studies

	Input Data
Two sided-confidence interval (%)	95
Number of Exposed	294
Prevalence/Coverage among Exposed (%)	7.82
Number of Non-exposed	8140
Prevalence/Coverage among Non-exposed (%)	3.49
Prevalence/Coverage Ratio	2.2
Prevalence Difference (%) <sup>1</sup>	4.33
<b>Power based on:</b>	
Normal approximation	97.36%
Normal approximation with continuity correction	96.2%

<sup>1</sup> Prevalence Difference = Prevalence in Exposed - Prevalence in Non-exposed.

### Datos de Migración

El porcentaje de personas que son originarias de Pajapan, Veracruz fue de 96%. De los entrevistados que no son originarios de Pajapan (12/294, 4%), 11 son de pueblos también de Veracruz (Figura 21) y un individuo de Oaxaca.

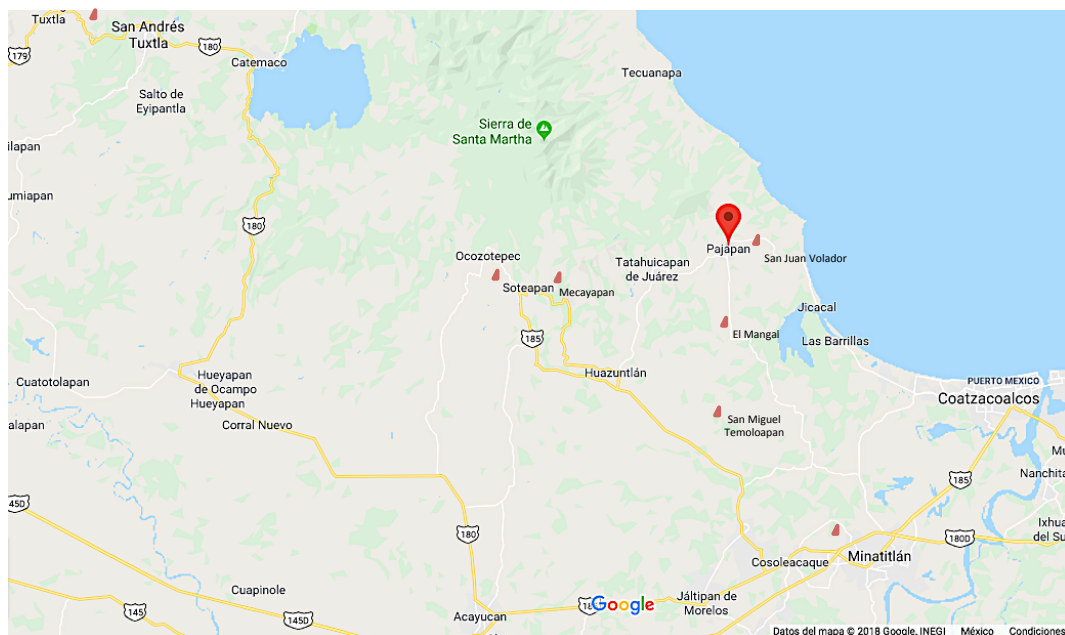


Figura 21. Mapa de la región del sur de Veracruz en donde se muestra la ubicación de Pajapan (globo rojo) y otras localidades aledañas de donde inmigraron individuos entrevistados durante la fase 3.

De acuerdo a la encuesta aplicada, 10.8% de la población emigra de Pajapan. La mayoría de los emigrantes (31%) tiene como destino el estado de Sinaloa, seguido el estado de Baja California (13%), otros municipios de Veracruz y el Estado de México. En la Figura 22 se resumen los destinos a donde emigraron temporalmente las personas entrevistadas.

Tomando en cuenta la tasa de inmigración de 4 y la de emigración de 10.8, la tasa de migración neta calculada para la población fue negativa, con un valor de -6.8. En otras palabras, Pajapan perdió 6.8 personas por cada 1000 residentes en los últimos 10 años.

Por otro lado, el 100% de los individuos heterocigotos, así como sus padres, fueron originarios de Pajapan. El 73.9% de estos sujetos informó que sus abuelos eran originarios del municipio (n=17) mientras que cinco individuos no pudieron dar información acerca de sus abuelos porque no sabían o no recordaban con certeza.

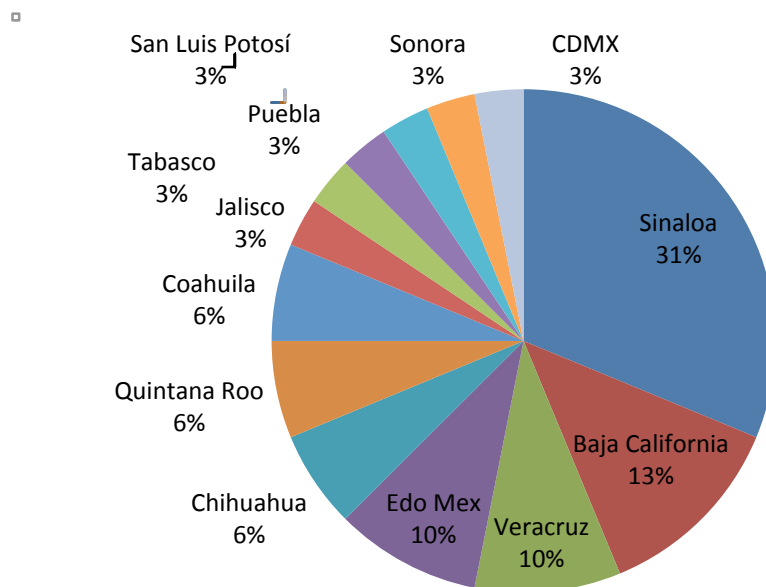


Figura 22. Distribución de estados en la República Mexicana a donde emigran habitantes de Pajapan, Veracruz.

## 9. Discusión

La ictiosis lamelar se encuentra dentro del catálogo de enfermedades raras ya que se estima que ocurre en menos de 1 en 200,000 individuos a nivel mundial (<https://rarediseases.org/rare-diseases/ichthyosis-lamellar/>). Sin embargo, existen algunas poblaciones con prevalencias más altas como Noruega con 1/91,000 (Pigg et al., 1998) y una región en la costa de Galicia en España con una prevalencia de 1/33,000 (Fachal et al., 2012). En Pajapan, Veracruz, encontramos una frecuencia de IL 1/935 la cual es la más alta reportada en la literatura. Es importante destacar que el conocimiento de esta población fue por reportes de los medios de comunicación ya que la comunidad y en particular la Fundación Yanavi, A.C. han buscado dar a conocer los casos de IL por medio de reportajes en noticieros locales y nacionales. Este es el primer trabajo de investigación que reporta un número oficial de la frecuencia de la enfermedad en la región y ejemplifica la escasa atención que se ha brindado a las enfermedades raras en México. Previamente, nuestro grupo de investigación había localizado a pacientes con IL en Puente de Alvarado, Veracruz de donde proviene en paciente 3372 en quien se realizó el estudio de secuenciación de exoma completo. Además, existen otras poblaciones dentro del estado de Veracruz como Ixhuatlán del Sureste (Rodríguez-García, Román-Andrade, & Izquierdo- Méndez, 2004) y Nogales, en donde la comunidad de El Campanario (697 habitantes) tiene un reporte de 17 individuos afectados con IL (Jorge Galindo, *Imagen de Veracruz*, <https://imagedeveracruz.mx/noticia/enfermos-de-ictiosis-no-han-recibido-ayuda-integral-5617>). El fenómeno de IL en el estado de Veracruz aún requiere de más estudios poblacionales y moleculares para poder definir el origen de la enfermedad y si es que en las otras poblaciones se encuentran las mismas variantes.

En cuanto a los datos clínicos de los nueve pacientes con IL incluidos en nuestro estudio, el fenotipo fue acorde a lo reportado en la literatura en individuos con mutaciones en el gen *TGMI*. Todos ellos nacieron con las características de “bebé colodión”, que fue reportado verbalmente por los padres como una capa fina en todo el cuerpo como celofán. Solo en dos pacientes (22%) se reportó eclabium al nacimiento. Al momento de la revisión clínica, el 100% presentó ectropión, lagofthalmos y las escamas café características en la totalidad del cuerpo. La alopecia frontal fue evidente en dos pacientes solamente. Estudios previos han reportado que la membrana colodión al nacimiento ( $p=.006$ ), ectropión ( $p=.001$ ), escamas grandes ( $p=.005$ ), alopecia ( $p=.001$ ) y el uso de retinoides sistémicos ( $p=.002$ ) se asocian significativamente a IL por mutaciones en *TGMI* (Farasat et al., 2009). El fenotipo asociado a



este gen es considerado grave dentro de las ARCI (Rodríguez-Pazos et al., 2011) y concuerda con el que presentan los pacientes de Pajapan. No se observó diferencia entre fenotipos de los pacientes 3.0 y 4.4 y el resto de los pacientes con el mismo genotipo. Diferencias en la gravedad de la enfermedad, por ejemplo el grado de alopecia y ectropión se han reportado en pacientes con distintos genotipos de *TGMI* (Cao et al., 2009), sin embargo, no se ha logrado una relación genotipo-fenotipo exacta ya que muchos pacientes en la literatura son heterocigotos compuestos y es común la ocurrencia de mutaciones privadas.

En lo relacionado al estudio genético, inicialmente se realizó estudio de secuenciación de exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) en un paciente de IL originario de Puente de Alvarado, Veracruz y se identificó una variante intrónica en estado homocigoto. El estudio de WES permitió establecer al gen *TGMI* como el asociado a la etiología de IL en este caso, ya que la enfermedad tiene heterogeneidad genética. Recientemente se ha demostrado la utilidad de distintas técnicas de secuenciación de nueva generación en el diagnóstico de las ARCI. Por ejemplo, en un estudio de 125 familias con ARCI en Irán, se utilizó un panel con 38 genes asociados a distintos fenotipos ictiosiformes. La tasa de detección en este estudio fue del 83.2% (Youssefian et al., 2018). El uso de técnicas de NGS como son WES y secuenciación de genoma completo además permiten la identificación de genes nuevos asociados a enfermedades hereditarias. Recientemente, se identificó por WES el gen *SULT2B1* por primera vez asociado a familias de Túnez con ARCI (Heinz et al., 2017). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió utilizar análisis WES en el caso de IL en Veracruz y se demostró que este era causado por una mutación intrónica homocigota en *TGMI*.

Con esta información, establecimos la hipótesis de que la IL observada en los pacientes de Pajapan se debiera a la misma variante intrónica que el paciente 3372, dado que ambas comunidades pertenecen a la costa del Golfo de México en Veracruz y se encuentran distantes a solo 250 kms. En consecuencia, se realizó secuenciación Sanger dirigida en los probandos de Pajapan quienes no presentaron la variante intrónica.

Se decidió entonces realizar el análisis de todo el gen *TGM1* en DNA de estos pacientes, lo que permitió la identificación de las variantes, c.427C>T en el exón 3 y c.760G>A en el exón 5. La variante en el exón 3 fue reportada por primera vez en población finlandesa (Laiho et al., 1997) y los programas de análisis *in silico* para predecir su patogenicidad indican que es una variante dañina. PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) (I. Adzhubei, Jordan, &

Sunyaev, 2013) es un software diseñado con base en la conservación entre especies y por ende evolutiva de un residuo de aminoácido. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) es un algoritmo utilizado para variantes de sentido equivocado que predice si el cambio de un aminoácido por otro modifica la función de la proteína (Kumar et al., 2009). Mutation Taster es otra herramienta en línea que clasifica la patogenicidad de las variantes e integra información de bases de datos poblacionales como 1000Genomes (Schwarz et al., 2014). Las tres herramientas mencionadas se utilizaron para probar la variante c.427C>T (p.Arg143Cys) y en SIFT y Mutation Taster la predicción fue de una variante dañina, en PolyPhen fue probablemente dañina. La patogenicidad de esta variante ya se confirmó a nivel funcional por otros grupos de investigación. Se sabe que el cambio de la arginina por cisteína localizada en el dominio beta-sándwich modifica la estructura cuaternaria de la transglutaminasa 1, provoca una acumulación menor a nivel intracelular y ocasiona una degradación acelerada de la proteína mutada cuando se compara con la silvestre (Laiho et al., 1997). De acuerdo a las guías del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y Asociación de Patología Molecular (Richards et al., 2015), esta variante cumple los criterios requeridos para llamarla *patogénica* y asociarla directamente como etiología de la IL en los pacientes que la presentan.

El exón 3 de *TGMI* es el segundo más frecuentemente mutado después del exón 8, y el residuo de arginina en la posición 143 es un sitio caliente (hot spot) mutacional. Es interesante mencionar que adyacente a este residuo, la variante Arg142His es la segunda más frecuente en pacientes con ARCI después de la de splicing, c.877-2A>G la cual se identifica en hasta el 40% de los pacientes a nivel mundial (Farasat et al., 2009; Herman et al., 2009). La proteína transglutaminasa 1 es rica en el aminoácido arginina y el 41% de todas sus mutaciones de sentido equivocado asociadas a ARCI afectan algún residuo de arginina. Los codones que codifican para este aminoácido son CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG pero todas las mutaciones reportadas en *TGMI* ocurren en los codones con el dinucleótido CpG. Esta frecuencia elevada de argininas mutadas en transglutaminasa 1 se puede deber a desaminación inducida de 5-metil citosina a timina, el cual es un mecanismo bien descrito de inducción de mutaciones (Herman et al., 2009).

La segunda variante en *TGMI* identificada en los pacientes de Pajapan se localizó en el exón 5 y correspondió a c.760G>A p.(Asp254Asn). Esta variante se reportó por primera vez en estado heterocigoto compuesto en un paciente chino con IL (Cao et al., 2009) y no hay reportes de la misma en otras poblaciones ni en estado homocigoto. En el paciente 3.0 se

demonstró en estado homocigoto mientras que la paciente 4.4 la es heterocigoto compuesto junto con la variante del exón 3. La madre de la paciente 4.4 es portadora sana de la variante en el exón 5 por lo que, excluyendo un evento *de novo*, es altamente probable que el padre sea el portador de la variante del exón 3. Durante el muestreo aleatorio de la tercera fase del estudio para detección de portadores, se obtuvo muestra de una tía paterna de la paciente 4.4 (individuo II.4 en la Figura 13a) y se demostró que era portadora de la variante c.760G>A en el exón 5.

Al igual que lo observado para la variante en el exón 3, los análisis para predicción de patogenicidad *in silico* realizados con PolyPhen2, SIFT y Mutation Taster clasifican como dañina a la variante c.760G>A p.(Asp254Asn) ubicada en el exón 5 de *TGMI*. De acuerdo a las guías del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y Asociación de Patología Molecular (Richards et al., 2015), esta variante cumple los criterios requeridos para clasificarla como *probablemente patogénica* (PM1, PM2, PM3, PP2, PP3, PP4) y asociarla directamente como etiología de la IL en los pacientes que la presentan. El aminoácido 254 se encuentra en el dominio catalítico de la proteína transglutaminasa 1, que es fundamental para el entrecruzamiento de proteínas estructurales como involucrina, loricrina y cistatina que forman la envoltura celular cornificada de la epidermis (Steinert & Marekov, 1995). Se ha demostrado que mutaciones en este dominio disminuyen la actividad enzimática de la proteína en comparación con la silvestre (Candi et al., 1998; Huber et al., 1997).

Interesantemente, los residuos afectados en nuestros pacientes, Arg143 y Asp254 interactúan mediante un puente de sal y unen el dominio beta-sándwich y el dominio catalítico central (Figura 23).

Retomando la situación especial de IL en el estado de Veracruz y sabiendo ahora que hay múltiples variantes presentes, es muy probable que la etiología en las otras regiones afectadas del estado sea por alteración de otros alelos en *TGMI* o incluso por variantes en otros genes asociados a IL.

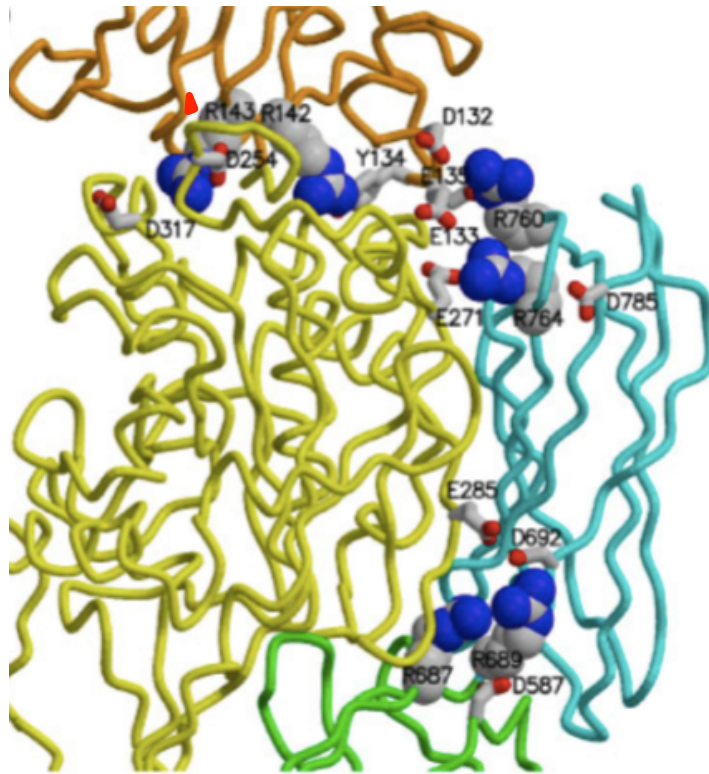


Figura 23. Modelo computacional de la proteína transglutaminasa 1. Se muestra el dominio beta-sándwich (naranja), el dominio catalítico central (amarillo) y la interacción entre ambos mediante los residuos R143 y D254 (círculo rojo) (Imagen tomada de (Herman et al., 2009)).

Durante la fase 3 del estudio, se estableció la prevalencia de portadores de la variante común en el exón 3 (c.427C>T). Aunque con los datos obtenidos no se puede llegar a una conclusión real de las frecuencias de portadores de IL en Pajapan, pues se desconoce la frecuencia de heterocigotos para la variante del exón 5, la información obtenida permite plantear un panorama general de la genética de la IL en Pajapan. Así, la prevalencia de portadores de la variante c.427C>T es de 7.8% (5.14-11.13) o 1:12.8 en individuos mayores de 18 años. Esta información es de gran trascendencia para estimar los riesgos de aparición de nuevos casos. De acuerdo a esta cifra y a los intervalos de confianza obtenidos se puede estimar que existen 658 (433-938) personas con la mutación de forma heterocigota en la totalidad de la población. De acuerdo a esta prevalencia, la posibilidad teórica de que dos sujetos heterocigotos de esta población se unan de forma aleatoria reproductiva es de 1 en 164 uniones. Sin embargo, dada la frecuencia de casos (n=9), es evidente que las uniones no se están produciendo al azar y que existe un efecto importante de la endogamia. Las cuatro familias afectadas con la variante en el exón 3 incluidas en este estudio no se conocen relacionadas entre sí pero tienen el mismo apellido, Martínez, en alguno de los padres. Interesantemente, de las 294 personas

entrevistadas, en 65 (22%) *Martínez* es al menos uno de sus dos apellidos y de los portadores de la variante en el exón 5, en 15 (68%) ocurre lo mismo. La isonimia se ha utilizado previamente como herramienta para calcular la consanguinidad de una población, sin embargo, se tiene que cumplir el supuesto de un apellido monofilético para este fin (Dipierrri et al., 2014). *Martínez* en México es un apellido polifilético y no se podría utilizar para calcular el índice de consanguinidad. Para este fin se tendría que recurrir a otros medios como estudios moleculares o al análisis de los registros oficiales de Pajapan. No obstante, es importante destacar que *Martínez* es el apellido más común en Pajapan, en los afectados con IL y en los portadores.

La migración es otra de las fuerzas que modifica las frecuencias alélicas. Por ejemplo, si existen más uniones con individuos que inmigran a Pajapan y tienen menor riesgo de portar la mutación, la ocurrencia de homocigotos para la variante patogénica disminuirá. Sin embargo, los datos obtenidos en Pajapan indican que hay una tasa neta negativa de migración y que existen más individuos que emigran hacia zonas con mayores oportunidades de trabajo que aquellos que inmigran a Pajapan por cuestiones personales o laborales. Este fenómeno sin embargo, tiene el efecto de disminuir la probabilidad de ingreso de sujetos portadores de la mutación y favorece en cambio que las uniones en la localidad se produzcan entre los mismos habitantes, que son los que tienen mayor riesgo de ser heterocigotos.

Los datos de antecedentes heredofamiliares obtenidos durante la primera fase y los de migración durante la tercera fase nos permiten concluir que el 100% de los individuos homocigotos así como sus padres son originarios de Pajapan, Veracruz. Los abuelos de los pacientes homocigotos también son originarios de Pajapan mientras que en los heterocigotos este dato se pudo confirmar en 74% de los entrevistados. Esta información apoya la hipótesis de un efecto fundador de la variante patogénica más común en Pajapan. De la variante en el exón 5 no se puede concluir lo mismo en este momento ya que sólo se identificaron a dos individuos y no se expandió en análisis a la población sana.

Cuando ocurre una misma mutación en varios pacientes de diferentes familias con la misma enfermedad se piensa en dos situaciones más comunes para explicar el fenómeno: un efecto fundador o un sitio caliente de mutaciones en el gen. En el efecto fundador se tiene que comprobar que la variante en todos los individuos se originó de un ancestro en común. La información potencial acerca de la edad de una mutación está disponible a partir de la

variación observada en marcadores genéticos estrechamente ligados como, por ejemplo, los microsatélites (Rannala & Bertorelle, 2001). Esta técnica de análisis de haplotipos se utilizó para comprobar el efecto fundador de las variantes c.2278C>T y c.1223\_1227del en el gen *TGMI* en Rías Baixas, Galicia (Fachal et al., 2012). Al confirmar que las variantes se originan de un ancestro en común, la hipótesis de que la variante ocurra independientemente en múltiples ocasiones por estar en un sitio caliente es altamente improbable. El análisis de haplotipos se ha utilizado también en población mexicana para además calcular el tiempo transcurrido desde que la mutación ingresó a la población de estudio. En San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala, por ejemplo, se identificó una mutación fundadora en *FOXE3* causante del complejo esclerocórnea-afaquia-microftalmia que apareció en la región aproximadamente 106-138 años atrás (Pantoja-Melendez et al., 2013).

Por otro lado, un sitio caliente para mutaciones en un gen es aquel que tiene una frecuencia excepcionalmente alta de mutaciones y en ocasiones el mecanismo de mutagénesis se relaciona con la secuencia de nucleótidos, en cuyo caso se llaman sitios calientes intrínsecos. Por ejemplo, el dinucleótido CpG al cual nos referimos anteriormente, está correlacionado con sitios calientes de mutaciones en genes humanos por la desaminación de la 5-metilcitosina hacia timina (Rogozin & Pavlov, 2003). Otra característica de los sitios calientes a nivel epidemiológico es que se pueden encontrar en diversas poblaciones que no tienen un origen ancestral en común. Por ejemplo, en *TGMI* se han descrito sitios calientes en los codones 142, 143, 379 y la posición intrónica c.877-2A>G (Farasat et al., 2009).

Los mecanismos de mutaciones fundadoras y de sitios calientes, sin embargo, no son mutuamente excluyentes. La variante intrónica de *TGMI* se ha reportado en múltiples poblaciones de IL a nivel mundial pero también está clasificada como mutación fundadora en población noruega (Pigg et al., 1998).

Existen múltiples ejemplos de poblaciones en donde ambas fuerzas y en ocasiones una tercera como la endogamia, se suman y resultan en frecuencias particularmente altas de enfermedades raras autosómicas recesivas, como es el caso de Pajapan,

En Arabia Saudita, la práctica de matrimonios consanguíneos es muy alta por factores socioculturales y religiosos y se estima una tasa de hasta el 50% de consanguinidad. El estudio de enfermedades autosómicas recesivas raras que se presentan en esa población ha

permitido diferenciar cuando la fuerza principal es una mutación fundadora o la consanguinidad propiamente. Por ejemplo, en un estudio de pacientes con síndrome de Alstrom se encontraron cuatro mutaciones nuevas diferentes en 4 familias, todas en estado homocigoto. La hipótesis inicial era encontrar una mutación fundadora en las cuatro familias pero al identificar cuatro distintas se concluyó que la consanguinidad fue la fuerza principal que determinó la presentación común de esta enfermedad sumamente rara (Aldahmesh et al., 2009). Ese fenómeno se observó en otros estudios que realizó el mismo grupo de trabajo con el síndrome camptodactilia –artropatía -coxa vara- pericarditis (Alazami, Al-Mayouf, Wyngaard, & Meyer, 2006) y con la córnea plana autosómica recesiva (Khan, Aldahmesh, & Meyer, 2006). Estos datos indican que es necesario estudiar estadísticamente la interacción entre un efecto fundador y la consanguinidad a nivel poblacional para determinar la tasa mutacional de un gen, ya que cuando esta tasa es muy baja es más probable que predomine el efecto fundador (Fang et al., 2002).

En el caso de Pajapan, al igual que en Arabia Saudita, lo inusual no es la presencia de mutaciones para una enfermedad rara en la población, sino el hecho de que se hayan agrupado dos de ellas en una población específica; y si se considera el estado completo de Veracruz como población, sabemos que al menos tres variantes en *TGMI* están presentes. Esto se puede explicar como un evento de azar, un evento migratorio o como se propuso en un estudio de revisión, un mecanismo de selección natural en donde ser portador de una variante en *TGMI* confiere algún tipo de ventaja para vivir en Veracruz, lo que es factible biológicamente pero muy difícil de comprobar (Zlotogora, 2007). El evento migratorio pudo haber sido el aislamiento de personas en Veracruz con ictiosis lamelar años atrás porque ya se ha observado que existe otro aislado poblacional en ese estado con la enfermedad. Esta hipótesis será difícil de comprobar ya que de inicio se tiene estudiar genéticamente la comunidad de El Campanario y posteriormente buscar registros históricos de la región para encontrar alguna evidencia del hecho. Este fenómeno se cree que sucedió en Bressuire, Francia en donde existe una frecuencia elevada de pacientes con síndrome de Usher asociadas a 11 variantes patogénicas distintas. A mediados del siglo 19 se abrió una institución para niños ciegos y sordos en esa región de Francia y se cree que el origen de esas mutaciones viene de familias afectadas que se mudaron de otras partes del país para que sus hijos pudieran acudir a la escuela (Gerber et al., 2006). Cualquiera de estas hipótesis aunada a la endogamia y la baja migración de Pajapan hará que la presencia de dos mutaciones diferentes

en el mismo gen se presenten en una enfermedad autosómica recesiva con más facilidad que en otra población que no comparte estas características.

En conclusión, con este trabajo se describe una población en territorio mexicano con la prevalencia más alta de ictiosis lamelar reportada a nivel mundial. La prevalencia de portadores del 7.8% es similar a las reportadas para otras poblaciones altamente consanguíneas en Medio Oriente y con otras enfermedades AR (Zlotogora et al., 2006). Aunque se requieren estudios de análisis de haplotipos para confirmar que la variante c.427C>T en el exón 3 tiene el mismo origen ancestral en todos los pacientes y llamarla fundadora, es altamente improbable que se haya originado de manera independiente en múltiples alelos. Una siguiente fase de estudio contempla realizar análisis de haplotipos así como investigación en archivos históricos de la costa sur de Veracruz para indagar acerca del origen de la población de Pajapan. Asimismo, se planea ampliar el estudio de portadores para la variante en el exón 5, c.760G>A. Esto contribuirá sin duda a expandir el conocimiento de las características de epidemiología molecular de la IL en esta población. Por otro lado, la identificación de portadores nos permite identificar a parejas en riesgo de tener hijos con IL y dar consejo genético con bases moleculares. El consejo genético en estas situaciones ha demostrado ser una herramienta como medicina de prevención muy efectiva ya que empodera a las parejas a tomar decisiones reproductivas informadas.



## 10. Bibliografía

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, (SUPPL.76). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Akbari, M. T., & Ataei-Kachoui, M. (2015). Triallelic inheritance of TGM1 and ALOXE3 mutations associated with severe phenotype of ichthyosis in an Iranian family - A case report. *Iranian Journal of Public Health*, 44(7), 1004–1007.
- Alazami, A. M., Al-Mayouf, S. M., Wyngaard, C.-A., & Meyer, B. (2006). Novel PRG4 mutations underlie CACP in Saudi families. *Human Mutation*, 27(2), 213–213. <https://doi.org/10.1002/humu.9399>
- Aldahmesh, M. A., Abu-safieh, L., Khan, A. O., Al-hassnan, Z. N., Shaheen, R., Rajab, M., ... Alkuraya, F. S. (2009). Allelic Heterogeneity in Inbred Populations : The Saudi Experience With Alström Syndrome as an Illustrative Example, (March), 662–665. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32753>
- Bittles, A.H. (2001). Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clinical Genetics*, 60(2), 89-98. <http://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2001.600201.x>
- Bittles, A. H. (2005). Endogamy, consanguinity and community disease profiles. *Community Genetics*, 8(1), 17–20. <https://doi.org/10.1159/000083332>
- Cao, X., Lin, Z., Yang, H., Bu, D., Tu, P., Chen, L., ... Yang, Y. (2009). New mutations in the transglutaminase 1 gene in three families with lamellar ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 34(8), 904–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03288.x>
- Carrasquillo, M. M., Zlotogora, J., Barges, S., & Chakravarti, A. (1997). Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: Implications for genetic studies in isolated populations. *Human Molecular Genetics*, 6(12), 2163–2172. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2163>
- Chial, H. (2008). Mendelian Genetics : Patterns of Inheritance and Single - Gene Disorders Autosomal Dominant Single - Gene Diseases. *Nature Education*, 1(1), 63.
- Dahlqvist, J., Klar, J., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., Pigg, M. H., Gedde-Dahl, T., ... Dahl, N. (2007). Congenital ichthyosis: mutations in ichthyin are associated with specific structural abnormalities in the granular layer of epidermis. *Journal of Medical Genetics*, 44(10), 615–20. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.050542>
- Dipierri, J., Rodríguez-Larralde, A., Barrai, I., Camelo, J. L., Redomero, E. G., Rodríguez, C. A., ... Alfaro, E. (2014). Random inbreeding, isonymy, and population isolates in Argentina. *Journal of Community Genetics*, 5(3), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s12687-013-0181-x>
- Eckl, K. M., Krieg, P., Küster, W., Traupe, H., André, F., Wittstruck, N., ... Hennies, H. C. (2005). Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Human Mutation*, 26(4), 351–361. <https://doi.org/10.1002/humu.20236>
- Fachal, L., Rodríguez-Pazos, L., Ginarte, M., Toribio, J., Salas, A., & Vega, A. (2012). Multiple local and recent founder effects of TGM1 in Spanish families. *PloS One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033580>
- Fang, L. J., Li, W., Chalhoub, N., Feingold, J., Ortenberg, J., & Thirion, J.-P. (2002). Linkage disequilibrium and founder effect analysis of the NF1 gene in French Canadians from the

- Quebec population. *Annales de Genetique*, 45, 39–44.
- Farasat, S., Wei, M.-H., Herman, M., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., Bale, S. J., ... Toro, J. R. (2009). Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA. *Journal of Medical Genetics*, 46(2), 103–111. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.060905>
- Fischer, J. (2009). Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(6), 1319–1321. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.57>
- Frank-kamenetskii, M. D. (2002). DNA Structure : Sequence Effects. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–9.
- Frost, P., Weinstein, G. D., & Van Scott, E. J. (1966). The ichthyosiform dermatoses. II. Autoradiographic studies of epidermal proliferation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 47(6), 561–567. <https://doi.org/10.1038/jid.1966.185>
- Gerber, S., Bonneau, D., Gilbert, B., Munnich, A., Dufier, J.-L., Rozet, J.-M., & Kaplan, J. (2006). USH1A: chronicle of a slow death. *American Journal of Human Genetics*, 78(2), 357–9. <https://doi.org/10.1086/500275>
- Gilchrist, S., & Bickmore, W. A. (2006). Chromosome Structures: Visualization. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005784>
- Grall, A., Guaguère, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., ... Fischer, J. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nature Genetics*, 44(2), 140–147. <https://doi.org/10.1038/ng.1056>
- Gupta, A., Sharma, Y., Deo, K., Vellarikkal, S., Jayarajan, R., Dixit, V., ... Sivasubbu, S. (2015). Case Report: Whole exome sequencing helps in accurate molecular diagnosis in siblings with a rare co-occurrence of paternally inherited 22q12 duplication and autosomal recessive non-syndromic ichthyosis. *F1000Research*, (0), 1–7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6779.1>
- Hatzikotoulas, K., Gilly, A., & Zeggini, E. (2014). Using population isolates in genetic association studies. *Briefings in Functional Genomics*, 13(5), 371–377. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu022>
- Heinz, L., Kim, G., Marrakchi, S., Christiansen, J., Turki, H., Rauschendorf, M., ... Fischer, J. (2017). Mutations in SULT2B1 Cause Autosomal-Recessive Congenital Ichthyosis in Humans. *The American Journal of Human Genetics*, 100(6), 926–939. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.05.007>
- Hellström Pigg, M., Bygum, A., Gånemo, A., Virtanen, M., Brandrup, F., Zimmer, A. D., ... Fischer, J. (2016). Spectrum of autosomal recessive congenital ichthyosis in scandinavia: Clinical characteristics and novel and recurrent mutations in 132 patients. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(7), 932–937. <https://doi.org/10.2340/00015555-2418>
- Hellström Pigg, M., Bygum, A., Gånemo, A., Virtanen, M., Brandrup, F., Zimmer, A., ... Fischer, J. (2014). Spectrum of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis in Scandinavia: Clinical Characteristics and Novel and Recurrent Mutations in 132 Patients. *Acta Dermato Venereologica*, 0. <https://doi.org/10.2340/00015555-2418>
- Herman, M. L., Farasat, S., Steinbach, P. J., Wei, M. H., Toure, O., Fleckman, P., ... Toro, J. R. (2009). Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: Summary of mutations(including 23 novel) and modeling of TGase-1. *Human Mutation*, 30(4), 537–547. <https://doi.org/10.1002/humu.20952>
- Huber, M., Yee, V. C., Burri, N., Vikerfors, E., Lavrijzen, A. P. M., Paller, A. S., & Hohl, D. (1997). Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21018–21026. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21018>
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic

- sequence of the human genome. *Nature*, 431(2), 931–945.  
<https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Israeli, S., Goldberg, I., Fuchs-Telem, D., Bergman, R., Indelman, M., Bitterman-Deutsch, O., ... Sprecher, E. (2013). Non-syndromic autosomal recessive congenital ichthyosis in the Israeli population. *Clinical and Experimental Dermatology*, 38(8).  
<https://doi.org/10.1111/ced.12148>
- Israeli, S., Khamaysi, Z., Fuchs-Telem, D., Nousbeck, J., Bergman, R., Sarig, O., & Sprecher, E. (2011). A mutation in LIPN, encoding epidermal lipase N, causes a late-onset form of autosomal-recessive congenital ichthyosis. *American Journal of Human Genetics*, 88(4), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.011>
- Jian, W., Du, Q.-T., Lai, Z.-F., Li, Y.-F., Li, S.-Q., Xiong, Z.-T., ... Chen, J.-S. (2018). Prenatal diagnose of a fetus with Harlequin ichthyosis in a Chinese family. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 57(3), 452–455.  
<https://doi.org/10.1016/J.TJOG.2018.04.023>
- Jollant, F., & Macdonald, C. (2015). Endogamy and suicide: An observation-based hypothesis. *Medical Hypotheses*, 85(5), 542–547.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.07.010>
- Khan, A. O., Aldahmesh, M., & Meyer, B. (2006). Recessive Cornea Plana in the Kingdom of Saudi Arabia. *Ophthalmology*, 113(10), 1773–1778.  
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.04.026>
- Krieg, P., Marks, F., & Fürstenberger, G. (2001). A gene cluster encoding human epidermis-type lipooxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics*, 73(3), 323–330. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6519>
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(8), 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Laiho, E., Ignatius, J., Mikkola, H., Yee, V. C., Teller, D. C., Niemi, K. M., ... Palotie, A. (1997). Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *American Journal of Human Genetics*, 61(3), 529–38. <https://doi.org/10.1086/515498>
- Larrègue, M., Ottavy, N., Bressieux, J. M., & Lorette, J. (1986). [Collodion baby: 32 new case reports]. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 113(9), 773–85.
- Lohmann, K., & Klein, C. (2014). Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 11(4), 699–707. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0288-8>
- Mazereeuw-Hautier, J., Aufenvenne, K., Deraison, C., Ahvazi, B., Oji, V., Traupe, H., & Hovnanian, A. (2009). Acral self-healing collodion baby: Report of a new clinical phenotype caused by a novel TGM1 mutation. *British Journal of Dermatology*, 161(2), 456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09277.x>
- Murase, C., Takeichi, T., Sugiura, K., Kobayashi, M., Shiomi, K., Ikebuchi, K., ... Akiyama, M. (2018). Hearing impairment: A secondary symptom in a congenital ichthyosiform erythroderma patient with ABCA12 mutations. *Journal of Dermatology*, (d), 1–2.  
<https://doi.org/10.1111/1346-8138.14350>
- Neveling, K., Feenstra, I., Gilissen, C., Hoefsloot, L. H., Kamsteeg, E. J., Mensenkamp, A. R., ... Nelen, M. R. (2013). A Post-Hoc Comparison of the Utility of Sanger Sequencing and Exome Sequencing for the Diagnosis of Heterogeneous Diseases. *Human Mutation*, 34(12), 1721–1726. <https://doi.org/10.1002/humu.22450>
- Norio. (2003a). *The Finnish disease heritage III : the individual diseases*. *Human Genetics* (Vol. 112). <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0877-1>
- Norio, R. (2003b). Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum*

- Genet.*, 112(5–6), 441–456. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0875-3>
- Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Blanchet Bardon, C., Bodemer, C., Bourrat, E., ... Traupe, H. (2010). Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorze 2009. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(4), 607–641. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.11.020>
- Oji, V., & Traupe, H. (2009). Ichthyosis Clinical manifestations and practical treatment options *Am J Clin Dermatol* 2009. *Am J Clin Dermatol*, 10(6), 351–364.
- Palamar, M., Karaca, I., Onay, H., Ertam, I., & Yagci, A. (2018). Dry eye and Meibomian gland dysfunction with meibography in patients with lamellar ichthyosis. *Contact Lens and Anterior Eye*, 41(2), 154–156. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.06.001>
- Pantoja-Melendez, C., Ali, M., & Zenteno, J. C. (2013). An epidemiological investigation of a Forkhead box protein E3 founder mutation underlying the high frequency of sclerocornea, aphakia, and microphthalmia in a Mexican village. *Molecular Vision*, 19(April), 1866–1870.
- Peltonen, L., Jalanko, A., & Varilo, T. (1999). Molecular genetics of the Finnish disease heritage. *Human Molecular Genetics*, 8(10), 1913–1923. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1913>
- Pesole, G. (2008). What is a gene? An updated operational definition. *Gene*, 417(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.03.010>
- Petersen, G. M., Rotter, J. I., Cantor, R. M., Leigh Field, L., Greenwald, S., Lim, J. S. T., ... Kaback, M. M. (1983). The Tay-Sachs Disease Gene in North American Jewish Populations: Geographic Variations and Origin TAY-SACHS DISEASE GENE. *Am J Hum Genet*, 35, 1258–1269.
- Petukhova, L., Shimomura, Y., Wajid, M., Gorroochurn, P., Hodge, S. E., & Christiano, A. M. (2009). The effect of inbreeding on the distribution of compound heterozygotes: A lesson from lipase h mutations in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. *Human Heredity*, 68(2), 117–130. <https://doi.org/10.1159/000212504>
- Pigg, M., Gedde-Dahl Jr., T., Cox, D., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., & Dahl, N. (1998). Strong founder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet*, 6(6), 589–596. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200224>
- Radner, F. P. W., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G.-J., Ribierre, F., Kamoun, B., ... Fischer, J. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003536. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003536>
- Rannala, B., & Bertorelle, G. (2001). Using linked markers to infer the age of a mutation. *Human Mutation*, 18(2), 87–100. <https://doi.org/10.1002/humu.1158>
- Richard, G. (2004). Molecular genetics of the ichthyoses. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 131 C(1), 32–44. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30032>
- Richard, G., & Bale, S. J. (2001). *Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis*. (R. Pagon, M. Adam, & H. Ardinger, Eds.), *GeneReviews*(®). Seattle: University of Washington, Seattle.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rodriguez-García, R., Román-Andrade, R., & Izquierdo- Méndez, J. A. (2004). Artículo Original-Ictiosis. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 4, 16–20.

- Rodríguez-Pazos, L., Ginarte, M., Fachal, L., Toribio, J., Carracedo, A., & Vega, A. (2011). Analysis of TGM1, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 and CYP4F22 in autosomal recessive congenital ichthyosis from Galicia (NW Spain): Evidence of founder effects. *British Journal of Dermatology*, *165*(4), 906–911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10454.x>
- Rogozin, I. B., & Pavlov, Y. I. (2003). Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *544*(1), 65–85. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00032-2)
- Russell, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G., & Bale, S. J. (1995). Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nature Genetics*, *9*, 279–283. <https://doi.org/10.1038/ng0395-279>
- Schmuth, M., Martinz, V., Janecke, A. R., Fauth, C., Schossig, A., Zschocke, J., & Gruber, R. (2012). Inherited ichthyoses/generalized Mendelian disorders of cornification. *European Journal of Human Genetics*, *21*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.121>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, *11*(4), 361–2. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Shevchenko, Y. O., Compton, J. G., Toro, J. R., DiGiovanna, J. J., & Bale, S. J. (2000). Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: Molecular, genetic, genealogic, and clinical studies. *Human Genetics*, *106*(5), 492–499. <https://doi.org/10.1007/s004390000284>
- Shwayder, T., & Ott, F. (1991). All about ichthyosis. *Pediatric Clinics of North America*, *38*(4), 835–857. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)38156-1](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)38156-1)
- Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(10), 782–92. <https://doi.org/10.1038/nrg1692>
- Steinert, P. M., & Marekov, L. N. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(30), 17702–11. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.30.17702>
- Takeichi, T., & Akiyama, M. (2016). Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *Journal of Dermatology*, *43*(3), 242–251. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13243>
- Teebi, A. S., & Keenedy, S. J. (2006). Autosomal Recessive Traits and Diseases. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002013>
- Thomas, A. C., Cullup, T., Norgett, E. E., Hill, T., Barton, S., Dale, B. a, ... Kelsell, D. P. (2006). ABCA12 is the major harlequin ichthyosis gene. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(11), 2408–2413. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700455>
- Turgut, B., Aydemir, O., Kaya, M., Türkçüoğlu, P., Demir, T., & Çeliker, Ü. (2009). Spontaneous corneal perforation in a patient with lamellar ichthyosis and dry eye. *Clinical Ophthalmology*, *3*(1), 611–613. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S8407>
- Youssefian, L., Vahidnezhad, H., Saeidian, A. H., Touati, A., Mahmoudi, H., Mansouri, P., & Daneshpazhoo, M. (2018). Autosomal recessive congenital ichthyosis : Genomic landscape and phenotypic spectrum in a cohort of 125 consanguineous families. *Hum Mutat*. <https://doi.org/10.1002/humu.23695>
- Zlotogora, J. (2007). Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations. *European Journal of Human Genetics*, *15*, 272–278. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201760>
- Zlotogora, J., Carasquillo, M., Barges, S., Shalev, S. A., Hujerat, Y., & Chakravarti, A. (2006). High incidence of deafness from three frequent connexin 26 mutations in an isolated community. *Genetic Testing*, *10*(1), 40–43.

<https://doi.org/10.1089/gte.2006.10.40>

## 11. Anexos

### 11.1 Historia Clínica

#### HISTORIA CLINICA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DATOS DEL PACIENTE

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Exped. \_\_\_\_\_ No. Caso \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_

DIAGNOSTICO O MOTIVO DE ENVIO:

ARBOL GENEALÓGICO

L= usa lentes

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES OCULARES

Cataratas congénitas o juveniles:

Glaucoma:

Malformaciones oculares:

Distrofias retinianas:

Nictalopía:

Estrabismo:

Discromatopsia:

Ceguera infantil o juvenil:

DATOS DE LA MADRE

Nombre: \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Nombre y lugar de nacimiento de su padre: \_\_\_\_\_

Nombre y lugar de nacimiento de su madre: \_\_\_\_\_

DATOS DEL PADRE

Nombre: \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Nombre y lugar de nacimiento de su padre: \_\_\_\_\_

Nombre y lugar de nacimiento de su madre:

DATOS DE LA PAREJA

Nombre:

Lugar de nacimiento:

Lugar de nacimiento de sus padres:

Edad:

Ocupación:

ANTECEDENTES PRENATALES

Duración de la gestación en semanas

Control Prenatal?

No. de consultas:

Enfermedades maternas durante la gestación

Ingesta materna de medicamentos, vitaminas?

Ingesta materna de alcohol, tabaco, narcóticos, inhalantes:

Enfermedades exantemáticas (rubéola, sarampión, varicela, etc)

Inicio de movilidad fetal e intensidad:

Edad de los padres:

NACIMIENTO

Tipo de parto:

Motivo de cesárea:

No. de gesta:

Lugar de atención:

Peso:

Talla:

PC:

Apgar:

Hipoxia neonatal?

Incubadora?

Ictericia?

Cianosis?

Convulsiones?

DESARROLLO PSICOMOTOR

Fija Mirada:

Sonrisa social:

Sostén cefálico

Sedestación:

Gateo:

Bipedestación:

Marcha:

Monosílabos:

Vocabulario:

Dentición:

Control de esfínteres:

Crecimiento:

Control motor fino/grueso:

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Vacunas:

Fuma?

Alcohol?

Drogas?

Alimentación:

Escolaridad:

Convivencia con animales domésticos:

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRICOS

Telarca

Pubarca:

Menarca:

RM:

Gestas:

P:

Ab:

Ces:

Uso de anticonceptivos:

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Enfermedades severas: (HAS, DM, CA, etc)

Exantemáticas:

Hospitalizaciones:

Cirugías:

Intoxicaciones:

Alergias:



Transfusiones:  
Fracturas:  
Convulsiones:  
Uso de lentes:  
Psiquiátricos:

PADECIMIENTO ACTUAL:

SINTOMATOLOGIA OCULAR:

Lagrimeo:  
Fotofobia:  
Discromatopsia:  
Nictalopía:  
Alteración de campo visual/escotomas (periférico/central):  
Diplopia:  
SCE:  
Ojo rojo:  
Dolor ocular:  
Visión borrosa:  
Pérdida súbita de la visión:  
HALLAZGOS OFTALMOLÓGICOS RELEVANTES (FECHA:            ):

Agudeza visual (fecha:            ): OD            (.)=            OI            (.)=  
Presión intraocular (fecha:            ): OD            OI  
HALLAZGOS FUNDOSCÓPICOS (FECHA:            ):

ESTUDIOS PREVIOS (ERG, FAG, USG, CV, etc):

APARATOS Y SISTEMAS:

Auditivo:  
Olfativo:  
Neurológico:  
Cardiovascular:  
Digestivo:  
Respiratorio:  
Genitourinario:  
Músculo-esquelético:  
Endocrino  
Piel y anexos

## EXPLORACIÓN FÍSICA

Hábitus externo:

Talla: PC: PT: PA: Peso:  
Brazada: Segmento Inferior: Segmento superior: SS/SI:

Cráneo: Frente:

Cabello:

Cara/facies:

Orejas: Tamaño: Posición: Apariencia: CAE:

Ojos:

Cejas: Pestañas:

Distancia intercantal:

Longitud de fisura palpebral OD: OI:

Movilidad ocular:

Iris:

Reflejos pupilares:

Coloración de escleras:

Nariz: Puente: Narinas: Punta:

Boca: Labios: Filtrum:

Paladar:

Dientes:

Lengua:

Cuello:

Tórax: Forma: Esternón: Costillas:

Ruidos cardiacos: Cardiopulmonar:

Abdomen: Ombligo:

Columna vertebral:

Genitales:

Extremidades:

Superiores: Inferiores:

Manos: Dedos: Pies: Ortejos:

Piel:

Tono muscular:

Comentarios

---

---

---

---

---

---

---

Impresión diagnóstica

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Recomendaciones/Planes**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Médicos tratantes**\_\_\_\_\_

## 11.2 Consentimiento informado

### CARTA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO

Yo (participante, padre o tutor) \_\_\_\_\_, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio "CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR DE ICTIOSIS LAMELAR EN PAJAPAN, VERACRUZ" que se realizará en el servicio de Genética del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" y que estará bajo la responsabilidad del Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa o mucosa oral y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción en el caso de sangre venosa. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que produjeron mi enfermedad. También se me ha señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en esta investigación en el momento en el que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital. Los investigadores se han comprometido a mantener la privacidad de mis datos personales así como la información que resultara de los estudios genéticos. Finalmente, manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir eventualmente.

Atentamente, \_\_\_\_\_(Nombre y firma)  
México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Dirección y teléfono del paciente: \_\_\_\_\_

Médico responsable: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo 1: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo 2: \_\_\_\_\_

## 11.3 Cuestionario

### CUESTIONARIO DE INFORMACIÓN CLÍNICA

Tubo \_\_\_\_\_

Nombre de la Calle y número (o referencia): \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ DD MM AAAA

### IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

1.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

2.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

3.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

4.- Fecha de nacimiento DD/MM/ AAAA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

5.- Sexo      Hombre      1      Mujer      2      6.- Teléfono: \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento 7.- País \_\_\_\_\_ 8.- Estado \_\_\_\_\_ 9.- Municipio \_\_\_\_\_

**Subraye el número que corresponda en las preguntas Si No P= PATERNO M= MATERNO**

### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

10. ¿Alguien en su familia presenta ictiosis?: No   0 Si   1

Si Sí, ¿quién? \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA MADRE** 11.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

12.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

13.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 14.- País \_\_\_\_\_ 15.- Estado \_\_\_\_\_ 16.- Municipio \_\_\_\_\_

17.- Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS DEL PADRE** 18.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

19.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

20.-Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 21.- País \_\_\_\_\_ 22.- Estado \_\_\_\_\_ 23.- Municipio \_\_\_\_\_

24.- Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELO P** 25.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

26.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

27.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 28.- País \_\_\_\_\_ 29.- Estado \_\_\_\_\_ 30.- Municipio \_\_\_\_\_

31.- Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELA P** 32.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

33.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

34.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 35.- País \_\_\_\_\_ 36.- Estado \_\_\_\_\_ 37.- Municipio \_\_\_\_\_

38.- Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELO M** 39.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

40.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

41.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 42.- País \_\_\_\_\_ 43.- Estado \_\_\_\_\_ 44.- Municipio \_\_\_\_\_

45.- Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELA M** 46.- Apellido Paterno \_\_\_\_\_

47.- Apellido Materno \_\_\_\_\_

48.- Nombre (s) \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: 49.- País \_\_\_\_\_ 50.- Estado \_\_\_\_\_ 51.- Municipio \_\_\_\_\_

52.- Localidad \_\_\_\_\_

### **MIGRACIÓN**

53.- ¿Ha vivido más de seis meses fuera de este estado? No 0 Si 1 (pase a la siguiente si la respuesta es Si)

54.- ¿Cuánto tiempo tiene de vivir en esta localidad desde la última vez que llegó?: \_\_\_\_\_

55.- ¿En donde vivía usted en el año 20 \_\_\_\_? Aquí en este estado: \_\_\_\_\_

En Otro estado: \_\_\_\_\_ Especifique: \_\_\_\_\_

¿Sus hijos viven en esta localidad ? 56.- No 0 Si 1 (pase a la siguiente si la respuesta es No)

En donde viven actualmente?

57.- Hijo 1 País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

58.- Hijo 2 País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

59.- Hijo 3 País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

60.- Hijo 4 País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

61.- Hijo 5 País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_