

## ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

### Estudio molecular de la ictiosis X y la ictiosis laminar\*

**Resumen.**—*Antecedentes.* Desde 1978, se sabe que la ictiosis X se asocia a un déficit de la enzima sulfatasa esteroidea (STS). La clonación y caracterización del gen de la STS ha permitido realizar estudios genéticos que facilitan el diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, el gen de la enzima transglutaminasa epidérmica (TGasa epidérmica) ha sido recientemente implicado en la etiopatogenia de la ictiosis laminar, pero también se han visto algunos casos sin anomalías genéticas en este locus, y otros pacientes con alteración en genes diferentes al de la TGasa epidérmica.

*Objetivos:* En este trabajo hemos analizado la organización molecular del gen de la sulfatasa esteroidea en pacientes diagnosticados clínicamente de ictiosis X, y hemos tratado de normalizar un método para detectar la presencia de portadoras de esta enfermedad. Por último, se han incluido en el estudio varios pacientes afectados de ictiosis laminar, una entidad genéticamente heterogénea, en los que se ha analizado la organización molecular de los genes que codifican las proteínas involucrina y filagrina, así como los exones 2 y 3 del gen de la enzima transglutaminasa epidérmica.

*Material y métodos:* Para el estudio de todos los pacientes se extrajo DNA de sangre periférica, aplicándose las técnicas de Southern blot y PCR en 26 pacientes con ictiosis X, y Southern blot y densitometría en 24 mujeres pertenecientes a las familias de los anteriores (12 portadoras obligadas y 12 posibles portadoras). En el caso de los pacientes con ictiosis laminar, se analizó el DNA por medio de Southern blot, PCR-SSCP y PCR-CFLP.

*Resultados:* Todos los pacientes con ictiosis X presentaron una delección total o parcial del gen de la sulfatasa esteroidea (STS). El estudio por densitometría de las mujeres pertenecientes a las familias con ictiosis X permitió clasificar como posibles portadoras a 9 de las 12 mujeres posibles portadoras incluidas en el estudio. De los ocho pacientes con ictiosis laminar estudiados, tres presentaron una alteración a nivel de los exones dos y tres del gen de la enzima transglutaminasa epidérmica por medio de la técnica PCR-CFLP.

**Palabras clave:** Ictiosis X. Sulfatasa esteroidea. Ictiosis laminar. Involucrina. Filagrina. Transglutaminasa epidérmica.

ÁNGELA HERNÁNDEZ MARTÍN  
ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO  
PABLO DE UNAM UNO PÉREZ  
*Departamento de Dermatología. Hospital  
Universitario. Salamanca.*

*Correspondencia:*

ÁNGELA HERNÁNDEZ MARTÍN. Dermato-  
logía. Fundación Hospital Alcorcón. Avda.  
Budapest, s/n. 28922 Alcorcón (Madrid).

Aceptado el 9 de septiembre de 1998.

\* Este es el resumen de la tesis doctoral  
que obtuvo el premio «Beecham» 1998.

### INTRODUCCIÓN

Las ictiosis constituyen un heterogéneo grupo de genodermatosis, tanto por su espectro clínico como por su diversidad genética y bioquímica. A pesar de la

posible similitud clínica de estos cuadros, cada uno de ellos es consecuencia de una alteración enzimática concreta y su transmisión se rige según diferentes leyes mendelianas de la herencia. Por ello, su diagnóstico exacto es esencial, tanto como base del consejo



FIG. 1.—Ictiosis X. Grandes escamas oscuras, muy adheridas, en cara anterior de piernas.

genético como porque se trata de la premisa necesaria para que, en un futuro, se pueda establecer el tratamiento más adecuado en cada caso.

**ICTOSIS X.** La ictiosis X es un trastorno hereditario de la queratinización que se hereda según un patrón recesivo ligado al cromosoma X, y que se caracteriza por la presencia de escamas poligonales de color marrón oscuro en diversas partes del cuerpo (Fig. 1). Las lesiones suelen distribuirse simétricamente, y, en general, son más evidentes en las superficies extensoras de las extremidades, sobre todo las inferiores. El cuero cabelludo presenta una descamación pitiriasiforme, mientras que la cara está habitualmente respetada, a excepción de la zona preauricular, localización patognomónica para algunos autores (1).

Shapiro y Koppe fueron los primeros autores en identificar la deficiencia de la enzima sulfatasa esteroidea (STS) en los fibroblastos de la piel de los pacientes con ictiosis X (2, 3). La STS (esterol sulfato sulfohidrolasa, EC 3.1.6.2) es una enzima hidrolítica insoluble ligada a la membrana microsomal, cuyos sustratos naturales mejor conocidos son el sulfato de dihidroepiandrosterona (DHEA-S) y el colesterol sulfato (4). La importancia de los esteroides sulfato y la STS en los procesos metabólicos del cuerpo humano se evidencia cuando existe un déficit en la actividad enzimática de la STS. Así, la placenta, un tejido de origen embrionario muy rico en STS, se encarga de desulfatar la DHEA-S materna y fetal como paso previo para la síntesis de estrógenos, por lo que en los embarazos con deficiencia de STS hay un descenso global de los mismos, producto final de la reacción. Clínicamente, este hecho se traduce en que las mujeres embarazadas de un feto afecto sufren un enlentecimiento del parto. En la epidermis, el déficit de STS altera las propiedades físicas de la mem-

brana celular, aumentando su estabilidad y el grado de cohesión intercelular y, en consecuencia, dificultando la descamación (5).

El gen que codifica la STS ha sido localizado en la parte distal del brazo corto del cromosoma X (Xp22.3pter) (6, 7). Esta zona resulta de gran interés por diversos motivos: 1) escapa a la inactivación (teoría de Lyon); 2) comparte importantes homologías con el cromosoma Y, y 3) es un área en la que, sin que se conozca el motivo, las deleciones ocurren con más frecuencia de lo habitual.

El gen de la STS contiene 10 exones y se extiende a lo largo de 146 kilobases de DNA, traducándose en una secuencia polipeptídica con actividad enzimática de 561 residuos (8). El cromosoma Y no tiene gen funcional de la STS, pero se sabe que existe una secuencia homóloga al mismo de 100 kilobases de longitud en el brazo largo del cromosoma Y (9). En concreto, solamente los exones 1, 5 y 10 son exclusivos del verdadero gen de la STS (10) motivo por el cual los estudios de amplificación del DNA por PCR solamente pueden llevarse a cabo con estos tres exones. Por otro lado, la existencia de esta secuencia homóloga en el cromosoma Y también justifica que aparezcan fragmentos de DNA exclusivos de los varones cuando se hibrida su DNA con el gen completo de la STS (8, 11-13).

El 90% de los pacientes con ictiosis X sufre una deleción completa del gen de la STS (11-16), lo que le convierte en el defecto genético con mayor incidencia de deleciones completas que existe (11). Han sido descritos muy pocos casos de deleciones parciales del gen de la STS (11-13, 17-19). Uno de los pacientes sufría una deleción intragénica de 45 Kb. localizada entre los intrones 1 y 5 (11) otro tenía una deleción de 150 Kb en el extremo 5' del gen (20) y tres más mostraban una deleción a nivel del extremo 3' (12, 17, 19). Algunos pacientes con ausencia total de actividad enzimática de STS no presentan alteraciones genéticas cuando se hibrida su DNA con el cDNA de la STS, ya que corresponden a mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos, capaces de provocar un cambio de aminoácido en la proteína final de la STS con repercusión funcional. Hasta el momento han sido descritos cuatro casos diferentes (21, 22). Por último, en 1996 se ha observado un paciente con ictiosis X en el que no se han podido demostrar alteraciones bioquímicas ni genéticas a nivel de la STS, postulándose la hipótesis de que la enfermedad pueda deberse también a alteraciones en otros puntos del genoma (23).

Los métodos diagnósticos más recientes se basan en el análisis directo del material genético. El empleo de

técnicas de laboratorio como la hibridación *in situ* (24) la PCR (19) y el *Southern blot* (11) ha permitido detectar y estudiar las deleciones del gen de la STS en los pacientes afectados. Los métodos genéticos también han supuesto un importante avance en la detección de portadoras, si bien todavía no están plenamente desarrollados. Algunos autores refieren resultados satisfactorios al comparar las diferencias entre la carga genética de individuos enfermos, portadoras heterocigotas y mujeres normales por medio de *Southern blot* y densitometría (25); otros han empleado con éxito la hibridación *in situ* para diagnóstico de portadoras, pero, hasta el momento, en ninguno de los dos casos los resultados están suficientemente confirmados (24).

**ICTIOSIS LAMINAR.** Las ictiosis laminares son un grupo de ictiosis congénitas no ampollas que han sido consideradas como un trastorno único durante largo tiempo. Sin embargo, a partir de mediados de la década de los 80, las diferencias bioquímicas entre las formas eritrodérmicas y no eritrodérmicas y la descripción de una variedad transmitida de manera autosómica dominante plantearon la posibilidad de que la ictiosis laminar no fuera una entidad nosológica unificada (26). Desafortunadamente, los fenotipos clínicos no se correlacionan exactamente con las características genotípicas, y por ello resulta difícil realizar una clasificación en subgrupos de la ictiosis laminar.

Las manifestaciones clínicas comienzan desde el nacimiento, momento en que se suele apreciar eritrodermia y descamación generalizadas. En otras ocasiones, el niño aparece envuelto en una película semejante al pegamento que se desprende en grandes láminas en el transcurso de las siguientes semanas, dejando un fondo eritematoso (27). Sin embargo, es preciso destacar que este cuadro, conocido como bebé colodión, no es específico de las ictiosis laminares, pudiendo aparecer en otros tipos de ictiosis (28). Se ha consi-

derado la eritrodermia como principal dato clínico que diferenciaría los diversos tipos de ictiosis laminar, de manera que se podría distinguir entre la ictiosis laminar eritrodérmica y la ictiosis laminar no eritrodérmica (29). Sin embargo, en muchas ocasiones resulta imposible distinguir entre una forma clínica y otra (27, 30).

Desde el punto de vista de la cinética celular, la eritrodermia ictiosiforme congénita es un trastorno hiperproliferativo epidérmico (31). Inmunohistoquímicamente, en la epidermis se observa una expresión variable de filagrina (32, 33) e involucrina (32-34), así como una disminución en la expresión de transglutaminasa (TGasa) en las formas no eritrodérmicas (35, 36).

Las TGasas (EC 2.3.2.13) son enzimas calcio-dependientes que catalizan reacciones de transferencia de un grupo  $\gamma$ -carboxilo desde un residuo de glutamina a un receptor  $\epsilon$ -amina, estableciendo enlaces  $N\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)-lisina. La involucrina y la loricrina constituyen dos de sus sustratos más afines. En los queratinocitos humanos existen tres formas de TGasas: la TGasa epidérmica o TGasa K, que representa la actividad enzimática TGasa más importante, la TGasa C y la TGasa E (37, 38). La función principal de las TGasas K y E es la formación de la envoltura cornificada durante la diferenciación terminal de las células epidérmicas (38).

El *locus* del gen que codifica la TGasa epidérmica ha sido localizado en el cromosoma 14 (14q11) (39) y consta de 14.133 pares de bases, distribuidos en 15 exones y 14 intrones. En 1994 se demostró por primera vez un ligamiento genético completo en el *locus* del gen de la TGasa epidérmica en 13 familias afectadas de ictiosis laminar (40). Los mismos autores identificaron tres mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos del gen (41). Más recientemente, se han detectado otras alteraciones genéticas en el *locus* del

**TABLA I:** ALTERACIONES MOLECULARES DEL GEN DE LA ENZIMA TRANSGLUTAMINASA EPIDÉRMICA EN LA ICTIOSIS LAMINAR

| Localización | Nucleótido | Repercusión                    | Referencia     |
|--------------|------------|--------------------------------|----------------|
| Exón 3       | 141        | Sustitución de Arg por His     | Russell, 1995a |
| Exón 3       | 142        | Sustitución de Arg por His     | Russell, 1995a |
| Exón 8       | 4.640      | Proteína truncada              | Huber, 1995a   |
| Intrón 5     | 3.366      | Proteína truncada              | Huber, 1995a   |
| Exón 2       | 950        | Sustitución de Ser por Tyr     | Huber, 1995a   |
| Exón 3       | 1.399      | Sustitución de Arg por His     | Huber, 1995a   |
| Exón 6       | 3.459      | Sustitución de Arg por Glu     | Huber, 1995a   |
| Exón 2       | 232        | —                              | Russell, 1995b |
| Exón 5       | —          | Deleción de dos pares de bases | Russell, 1995b |
| Intrón 5     | —          | Alteración del sitio aceptor   | Russell, 1995b |
| Exón 11      | —          | Sustitución de Met por Val     | Russell, 1995b |

gen de la TGasa epidérmica en diferentes familias afectadas de ictiosis laminar (39, 42, 43). Sin embargo, se sabe que existen casos de ictiosis laminar en los que este gen no está implicado (42, 44, 45). En 1996 se ha localizado un segundo *locus* en el cromosoma 2 (2q33-35), que pudiera estar implicado en la patogenia de la ictiosis laminar (46) si bien a este nivel no se ha identificado ningún un gen que pueda justificar la aparición de la patología cutánea (tabla I).

En definitiva, la ictiosis laminar es una entidad genéticamente heterogénea, hecho que dificulta extraordinariamente el diagnóstico genético de la enfermedad. Hasta el momento se desconoce si esta heterogeneidad genética condiciona las comentadas diferencias clínicas, pero el hecho de que pacientes pertenecientes a la misma familia muestren diferente fenotipo clínico no parece apoyar esta teoría.

En este trabajo hemos analizado las alteraciones moleculares del gen de la STS en pacientes diagnosticados clínicamente de ictiosis X, y hemos tratado de detectar portadoras de esta enfermedad analizando cuantitativamente su carga genética. Finalmente, hemos estudiado la organización molecular de los genes de la filagrina y la involucrina, así como los exones 2 y 3 del gen de la TGasa epidérmica, en pacientes con ictiosis laminar, si bien la heterogeneidad genética de este trastorno dificulta extraordinariamente su análisis genético.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Se incluyeron un total de 65 individuos, de los cuales 34 habían sido diagnosticados de ictiosis X o ictiosis laminar en el servicio de dermatología del hospital y 27 eran mujeres pertenecientes a las familias de los varones afectados de ictiosis X. Estos individuos se distribuían numéricamente como sigue: 26 varones afectados de ictiosis X, pertenecientes a 20 familias diferentes y con manifestaciones clínicas características en todos los casos; 13 mujeres portadoras de ictiosis X (madres e hijas de varones enfermos); 14 mujeres posibles portadoras de ictiosis X (hijas de mujeres portadoras y hermanas de varones enfermos); ocho pacientes de ictiosis laminar (cinco mujeres y tres varones), de los cuales cinco padecían la forma eritrodérmica y tres la forma no eritrodérmica de la enfermedad. Además, se incluyeron cuatro casos más en los cuales la clasificación clínica era dudosa entre ictiosis X e ictiosis vulgar.



FIG. 2.—Ictiosis laminar. Eritrodermia marcada, con escamas grandes y parcialmente desprendidas (eritrodermia ictiosiforme congénita).

### Protocolo de estudio clínico

Tanto en la ictiosis X como en la ictiosis laminar, se valoraron datos exclusivamente dermatológicos de la enfermedad, incluyendo, en la ictiosis X, antecedentes familiares, edad en la primera consulta y de inicio de la enfermedad y manifestaciones clínicas (morfología de la lesión, afectación de cuero cabelludo, flexuras y cervicofacial). En la ictiosis laminar se incluyeron antecedentes familiares, consanguinidad parental, edad de inicio, edad de la primera consulta y manifestaciones clínicas (eritrodermia, queratodermia palmoplantar, alopecia y ectropion).

### Método de Southern

Para el estudio de todos los individuos, se obtuvieron células nucleadas a partir de muestras de sangre periférica conseguidas por venopunción, aislándose el DNA total de alto peso molecular. La muestra de DNA, con una concentración entre 1.000 y 1.500 mg/ml, se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación por microorganismos.

Con el DNA obtenido se llevó a cabo el método de Southern (81) utilizando las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII. Las sondas empleadas en el estudio para hibridar el DNA fueron las siguientes: p2A7, sonda de cDNA de 2.7 Kb clonada en el vector puc18 que contiene el extremo 3' del gen ST (56,82%). El inserto completo híbrida con secuencias de los cromosomas X e Y. No obstante un fragmento PvuII/ EcoRI de 1.7 Kb generado a partir de la sonda total híbrida sólo con secuencias del cromosoma X (56). A partir de este clon se generaron las sondas RH0,9, específica del cromosoma X y RH1,8 que reconoce secuencias de los cromosomas X e Y (Fig. 7). pLambda1-3, fragmento ge-

nómico clonado en el vector psp64, de extremos BamHI y HindIII de 6 kb, que contiene toda la secuencia codificante del gen de la involucrina, incluyendo la región 5' no trasladable, dos exones y un intrón. HHCC64, sonda de cDNA de 0,9 kb que contiene secuencias codificantes del gen de la filagrina.

#### Amplificación de DNA mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega), 500 ng de DNA molde y 0,2 mg de cada oligonucleótido cebador, en un volumen final de reacción de 50 ml. En todos los casos se llevó a cabo una reacción sin DNA molde como control negativo.

El exón 1 del gen STS se amplificó utilizando los oligonucleótidos cebadores 5STS1: GGCCTAGAAGAAGGTTGAAGGTCCC y 3STS1: AAGAGGTTGGATGAGATGGGCATAC, con lo que amplificamos un fragmento de 292 pb. El exón 5 de este gen se analizó utilizando los cebadores 5STS5: ACCACCTTTACATCACGGC y 5STS3: CCTCCAGTTGAGTAGCTGTTGAGCT, que amplifican un fragmento de 359 pb.

Los exones 2 y 3 del gen de la transglutaminasa epidérmica se analizaron con los cebadores 5TGT: ACTGGCTGGACTACCTGGAAA y 3TGT: GCCTCTCCCCACCAAACATAG, que amplifican un fragmento de 780 pb que contiene ambos exones.

#### Densitometría

La cuantificación densitométrica se llevó a cabo en un sistema bioimagen (Millipore), empleando el *software Visage*.

#### SSCP (Single-Strand Conformational Polimorphism)

Para realizar esta técnica, que permite detectar un alto porcentaje de mutaciones en función de la configuración cuaternaria de DNA monocatenario, se utilizaron 5 ml del producto de PCR. El DNA se desnaturalizó por calor (5 min a 100 °C) con un tampón adecuado y se sometió a electroforesis vertical en geles de acrilamida al 6%.

#### CFLP (Cleavase Fragment Length Polymorphism)

Los productos de la PCR se analizaron también mediante la técnica de CFLP, que aprovecha la enzima cleavasa, endonucleasa que reconoce y digiere el ex-

tremo 5' de los anillamientos producidos en el DNA monocatenario (Hansen, 1995). Los fragmentos generados se observaron tras electroforesis en geles de acrilamida al 6% y tinción con nitrato de plata.

## RESULTADOS

#### Resultados clínicos

De los 26 pacientes diagnosticados de ictiosis X incluidos en el estudio, 23 (88,4%) presentaban antecedentes familiares de la enfermedad y tres carecían de ellos (11,5%). El 69,2% de los casos consultó por primera vez durante la infancia, mientras que el 30,7% restante lo hizo después de los 14 años (18 y 8 pacientes respectivamente). La presentación de la enfermedad tuvo lugar en el momento del nacimiento en ocho pacientes (30,7% de los casos), a lo largo del primer mes en nueve pacientes (34,6%), entre el primer mes y el primer año de vida en siete pacientes (26,9%), y después de este momento en el 3,8% de los enfermos (un paciente). En uno de los individuos analizados no se pudo verificar la edad de inicio de la enfermedad. En cuanto a las manifestaciones clínicas, el 100% de los casos presentaba manifestaciones fenotípicas características de la ictiosis X, estando afectado el cuero cabelludo en 25 de ellos (96,1% de los casos), las flexuras en 15 (57,7%) y la región cervicofacial en otros 15 enfermos (tabla II).

Se observaron antecedentes familiares en tres de los

**TABLA II: RESULTADOS CLÍNICOS CORRESPONDIENTES A LOS 26 PACIENTES CON ICTIOSIS X**

|                          |                           |         |    |
|--------------------------|---------------------------|---------|----|
| Antecedentes familiares  | Sí                        |         | 23 |
|                          | No                        |         | 3  |
| Edad de consulta         | 0-14 años                 |         | 18 |
|                          | > 14 años                 |         | 8  |
| Edad de inicio           | Nacimiento                |         | 8  |
|                          | Primer mes                |         | 9  |
|                          | Primer mes-1 año          |         | 7  |
|                          | > 1 año                   |         | 1  |
|                          | NC*                       |         | 1  |
| Manifestaciones clínicas | Morfología:               | Típica  | 26 |
|                          |                           | Atípica | 0  |
|                          | Cuero cabelludo:          | Sí      | 25 |
|                          |                           | No      | 1  |
|                          | Flexuras:                 | Sí      | 15 |
|                          |                           | No      | 11 |
|                          | Cervicofacial:            | Sí      | 15 |
|                          |                           | No      | 10 |
|                          |                           | NC      | 1  |
|                          | Otros hallazgos (prurito) |         | 4  |

\* NC: No consta.

**TABLA III: RESULTADOS CLÍNICOS CORRESPONDIENTES A LOS PACIENTES CON ICTIOSIS LAMINAR**

|                          |                           |   |
|--------------------------|---------------------------|---|
| Antecedentes familiares  | Sí                        | 3 |
|                          | No                        | 5 |
| Cosanguinidad            | Sí                        | 6 |
|                          | No                        | 2 |
| Edad de inicio           | Nacimiento: Bebé colodión | 4 |
|                          | No bebé colodión          | 1 |
|                          | Después del nacimiento    | 3 |
| Edad de consulta         | 0-14 años                 | 2 |
|                          | > 14 años                 | 6 |
| Manifestaciones clínicas | Eritrodermia: Sí          | 5 |
|                          | No                        | 3 |
|                          | Queratodermia: Sí         | 8 |
|                          | No                        | 0 |
|                          | Alopecia: Sí              | 3 |
|                          | No                        | 5 |
| Ectropion:               | Sí                        | 4 |
|                          | No                        | 4 |

ocho pacientes diagnosticados de ictiosis laminar (37,5%), con una tasa de cosanguinidad entre los padres del 87,5% (siete de los ocho pacientes). La enfermedad se determinó en el momento del nacimiento en cinco de los casos totales (62,5%), siendo en forma de bebé colodión en el 80% de ellos. Los tres casos restantes debutaron más tardíamente, pero también en etapas tempranas de la infancia. Solamente dos de los casos consultaron por primera vez antes de los 14 años (25%), mientras que el resto lo hicieron en la edad adulta. En relación con las manifestaciones clínicas, cinco pacientes presentaban la forma eritrodérmica de la enfermedad (62,5%) y tres la forma no eritrodérmica (37,5%). La queratodermia se observó en la totalidad de los pacientes, alopecia en el 62,5% (cinco de los ocho casos) y el ectropion en la mitad de ellos (tabla III).

#### Análisis molecular del gen de la STS en pacientes con ictiosis X

Para el estudio mediante *Southern blot*, se incluyeron 26 pacientes diagnosticados de ictiosis X en el ser-

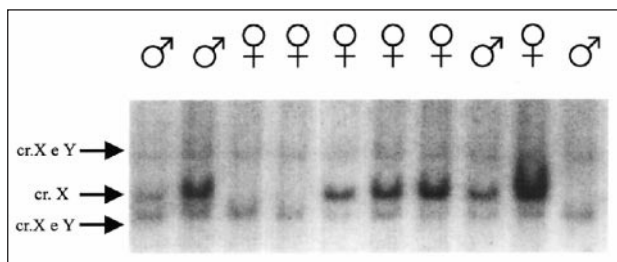


FIG. 3.—Autorradiografía de DNA hibridado con la sonda p2A7 en la que se demuestra que la misma reconoce secuencias del cromosoma X y el cromosoma Y.

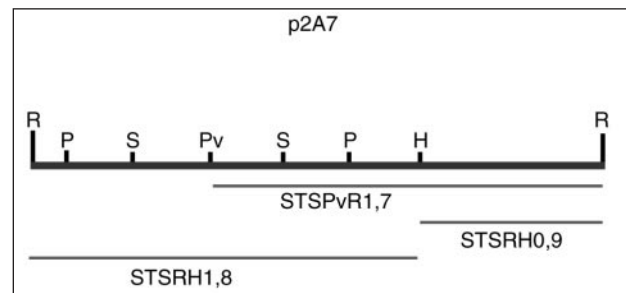


FIG. 4.—Representación esquemática de la sonda p2A7 y las sondas generadas a partir de ella y empleadas en nuestro estudio. (R: EcoRI, P: PstI, Pv: PvuII, s: SacI, H: HindIII).

vicio de dermatología del hospital Universitario de Salamanca y dos casos más de en los que el diagnóstico clínico era dudoso. Inicialmente, se utilizó una sonda que contenía el cDNA completo de la STS (clon p2A7). Como se muestra en la Figura 3, la hibridación con esta sonda reconoce también secuencias presentes en el cromosoma Y, por lo que decidimos generar subclones de la misma que nos permitieran detectar de manera exclusiva secuencias del cromosoma X (Fig. 4).

La sonda STS PvR1.7, que reconoce secuencias en el extremo 3' del gen, permitió detectar un fragmento germinal único de 3.8 Kb. Los 26 varones con ictiosis X carecían de este fragmento germinal (Fig. 5), mientras que, por el contrario, los dos pacientes dudosos presentaron la mencionada banda. Curiosamente, en uno de los pacientes no se detectó el fragmento de 3.8 Kb, pero sí un fragmento de mayor tamaño (7 Kb), hallazgo que se repitió en el DNA de su madre y su hermana, las cuales presentaban este fragmento junto con el fragmento germinal (Fig. 6). Con el fin de delimitar la anomalía genética de este paciente, procedimos a realizar amplificación mediante PCR de los exones 1 y 5 del gen de la STS, estando ambos exones presentes.

Paralelamente, se procedió a la amplificación de los exones 1 y 5 del gen de la STS en todos los pacientes varones diagnosticados de ictiosis X que presentaban delección por método de *Southern*, comprobándose que

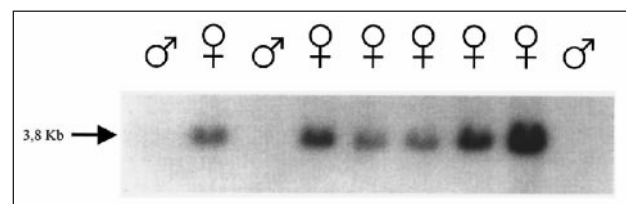


FIG. 5.—Autorradiografía que muestra la ausencia de hibridación de la sonda STS en dos pacientes diagnosticados de ictiosis X. Se muestra también la hibridación en DNA procedentes de mujeres familiares de estos mismos pacientes.

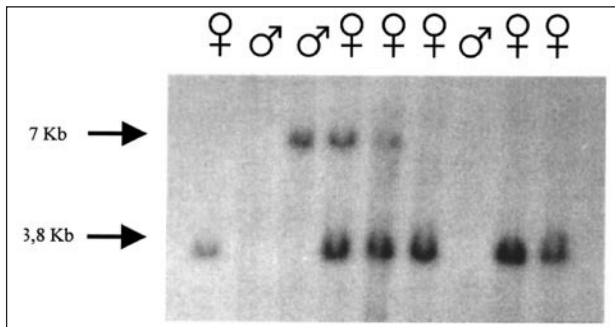


FIG. 6.—Autorradiografía que muestra la presencia de un fragmento de tamaño anómalo en un paciente del ADN diagnosticado de ictiosis X, su madre y su hermana. Asimismo, se muestran otros dos pacientes portadores de delección en el gen de la STS.

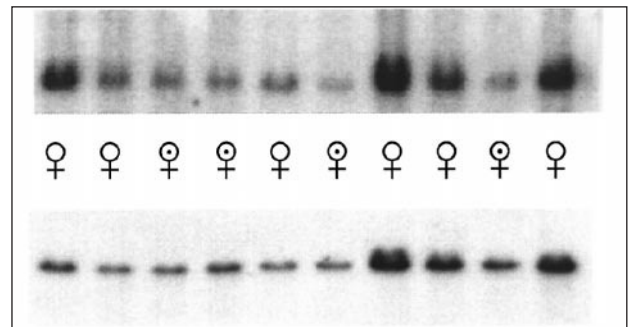


FIG. 8.—Autorradiografías del ADN de mujeres portadoras obligadas ( ) y mujeres de *status* desconocido tras la hibridación con la sonda STS (superior) e involucrina (inferior).

en cinco de los 26 pacientes se mantenían los exones 1 y 5 de este gen (Fig. 7). Asimismo, se realizó el estudio mediante PCR de los otros dos pacientes con diagnóstico dudoso, sin que en ningún caso se amplificara ninguno de los dos exones.

Por último, el estudio por método de *Southern* de las madres y hermanas de los pacientes no mostró alteraciones del gen de la STS en ningún caso (Fig. 5).

*Caracterización de portadoras de ictiosis X*

Todas las mujeres incluidas en el estudio, independientemente del grado de parentesco con los varones diagnosticados de ictiosis X, mostraron la existencia del gen STS tras estudios de Southern blot. Con el fin de normalizar un método para detectar portadoras de delección en uno de los alelos del gen STS, se llevó a cabo un estudio densitométrico de los filtros que contenían DNA genómico de todas las mujeres posibles portadoras, digerido con la enzima de restricción EcoRI, para así tratar de demostrar diferencias cuantitativas en la carga genética. La hibridación se realizó con la sonda STS0.9 (Fig. 4) y, como control, una sonda del gen de la involucrina, que se localiza en el cromosoma 1 y que, por tanto, es teóricamente normal

tanto en mujeres portadoras como en mujeres no portadoras (Fig. 8). Se excluyeron las dos pacientes en las que se detectó una banda anormal tras la hibridación de su DNA con la sonda STS PvR1.7, puesto que ambas poseían la misma alteración genética que el varón enfermo perteneciente a su familia, y se podía afirmar directamente que eran portadoras de la enfermedad.

En la Figura 9 muestran los resultados obtenidos para los dos grupos experimentales analizados. Como se puede ver, en el caso de las portadoras (en blanco), la variabilidad es mucho menor que en el caso del grupo mixto, que incluye portadoras y no portadoras (*status* desconocido antes del estudio). La diferencia media es de 0,234, con una desviación típica de 0,815 (cálculos no mostrados). El test de normalidad para muestras pequeñas (test de Shapiro-Wilks) resulta no significativo ( $p = 0,9423$ ), y, por tanto, consideramos normal la distribución. Seleccionando como punto de corte aquel valor de la variable «diferencia», que solamente supera el 5% de las portadoras, para una sensibilidad del 5% el valor es de 1.575; es decir, se clasifica como portadora aquella paciente cuya diferencia sea inferior a 1,575 y como no portadora cuando la diferencia sea superior. Utilizando este punto para clasificar al grupo de mezcla se obtiene que de las 13 portadoras seguras, 12 se

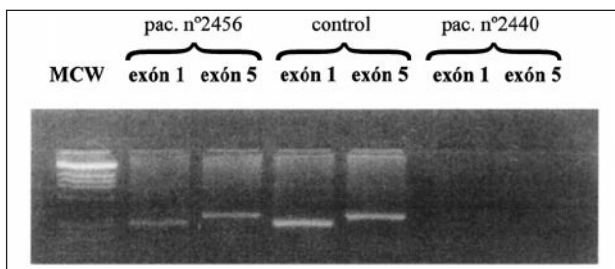


FIG. 7.—Amplificación por PCR de los exones 1 y 5 del gen de la STS en el paciente número 2.456, perteneciente a la familia 8 (delección parcial), de un paciente control, y en el paciente número 2.440, perteneciente a la familia 1 (delección total).

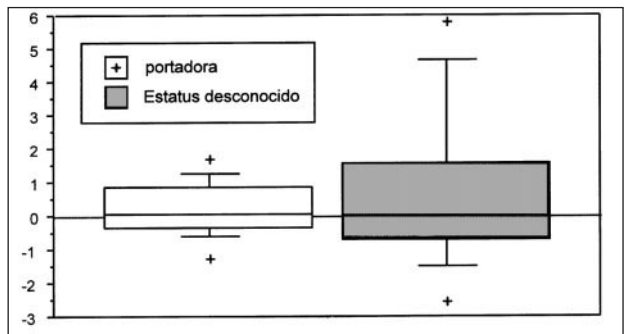


FIG. 9.—Distribución de mujeres portadoras y no portadoras.

clasifican en el grupo correcto y una se encuadra dentro de las no portadoras; de las 12 desconocidas, nueve se clasifican como portadoras y tres como no portadoras. Si se considera el 1%, el punto de corte obtenido es 2,127. En este caso, todas las portadoras se han clasificado correctamente mientras que en el grupo de las desconocidas, la clasificación sigue siendo la misma. La tabla IV contiene los valores para todos los pacientes y la clasificación realizada.

#### *Estudio molecular de pacientes diagnosticados de ictiosis laminar*

El estudio mediante método de *Southern* de la organización de los genes de la involucrina y la filagrina descartó la presencia de alteraciones de gran tamaño en su organización molecular. Además, y ante la existencia de casos de ictiosis laminar asociados a alteraciones en los exones 2 y 3 del gen de la transglutaminasa (tabla I), diseñamos un par de oligonucleótidos cebadores específicos que amplifican un fragmento de 780 pares de bases que incluye estos dos exones. El producto de la PCR fue analizado por SSCP, sin que fuera detectada ninguna alteración. No obstante, y ante el tamaño del fragmento amplificado, que está en los límites de resolución de la técnica de SSCP, se digirió el producto de PCR con el enzima SphI que genera dos fragmentos de 520 y 235 pb, sin que tampoco se objetivara anomalía genética alguna. En paralelo, realizamos un estudio del fragmento completo utilizando la capacidad del enzima *Cleava* de cortar fragmentos monocatenarios de DNA plegados sobre sí mismos, generando fragmentos de distintos tamaños en el caso de existir mutaciones, descubriéndose la existencia de tres casos en los que se generaron nuevos fragmentos compatibles con la existencia de las mismas (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

En la gran mayoría de los casos, los datos clínicos propios de la ictiosis X son inequívocos, y permiten el diagnóstico *de visu* de la enfermedad. Sin embargo, un pequeño porcentaje de los pacientes muestra criterios clínicos, e incluso histológicos, comunes a la ictiosis vulgar, por lo que resulta imprescindible recurrir a métodos de laboratorio para realizar el diagnóstico de certeza (19). En cuanto a la ictiosis laminar, está fuera de duda la heterogeneidad clínica, histológica y bioquímica de la misma, hecho que dificulta sobremanera su clasificación en subgrupos. Los estudios

genéticos de que se dispone en la actualidad confirman la heterogeneidad de la ictiosis laminar desde este punto de vista también.

#### *Resultados clínicos*

Como se aprecia en la tabla II, 23 de los 26 pacientes diagnosticados de ictiosis X poseían antecedentes familiares de la enfermedad, tal y como es de esperar en enfermedades de transmisión recesiva ligada al sexo. La ausencia de antecedentes familiares en los tres restantes puede explicarse como resultado de una alteración genética *de novo* en el enfermo o en su madre (25). También cabe la posibilidad de que la investigación genealógica no haya sido lo suficientemente extensa como para detectar la existencia de otros familiares afectados por la enfermedad.

La edad de inicio de la enfermedad en 17 de los 26 pacientes estudiados fue anterior al primer mes de vida (65,5% de los casos), observación que concuerda con la de otros autores (46, 47). Dado que todos menos uno debutaron antes del primer año de vida, es lógico que la mayoría de ellos (18 de los 26 enfermos) fueran diagnosticados durante la niñez. Este hecho repercute directamente en el tipo de manifestaciones observadas, puesto que el proceso se modifica y pierde expresividad con el transcurso de los años.

Todos los casos presentaron las manifestaciones fenotípicas características de la ictiosis X, con descamación en escamas grandes de color oscuro en tronco, cuello y extremidades, de aspecto furfuráceo a nivel facial y pitiriasiforme en cuero cabelludo. La topografía de las lesiones fue, asimismo, típica. El cuero cabelludo estaba interesado en 25 de los 26 casos, por lo que podemos decir que es la localización que con más frecuencia se encuentra afectada en la ictiosis X, independientemente de la edad. Las flexuras presentaban alteraciones en más de la mitad de los casos, porcentaje más elevado que el referido en otros estudios (10-30% de los casos) (20, 49). En cuanto a la región cervicofacial (cuello, pabellones auriculares y región preauricular principalmente), se encontró afectada en 15 de los 26 pacientes, proporción semejante a la previamente descrita (47). Ninguno de los pacientes analizados presentó manifestaciones clínicas específicas y diferentes del resto, de lo que se deduce que las alteraciones moleculares del gen de la STS se traducen en la misma manifestación fenotípica, independientemente del tipo de anomalía genética existente.

Los hallazgos clínicos en los ocho pacientes con ictiosis laminar estudiados se corresponden con los descritos previamente en otras series (26) (tabla III). So-



**TABLA IV:** DIFERENCIAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DENSITOMÉTRICO REALIZADO CON LAS SONDAS INVOLUCRINA Y STS, Y CLASIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS MUJERES ANALIZADAS

| N.º de registro | Involucrina | STS  | Diferencia | Estatus   | Sensibilidad 5% | Sensibilidad 1% |
|-----------------|-------------|------|------------|-----------|-----------------|-----------------|
| 2.431           | 0,94        | 1,33 | 0,39       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.435           | 0,66        | 1,66 | 1          | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.436           | 1,09        | 0,9  | -0,2       | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.437           | 1,51        | 1,04 | -0,47      | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.438           | 3,19        | 2,87 | -0,32      | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.439           | 2,63        | 8,44 | 5,81       | ???       | No portadora    | No portadora    |
| 2.445           | 0,58        | 0,64 | 0,06       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.485           | 0,39        | 1,58 | 1,19       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.481           | 1,23        | 2,08 | 0,86       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.483           | 0,52        | 3,12 | 2,61       | ???       | No portadora    | No portadora    |
| 2.495           | 0,17        | 0,68 | 0,51       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.564           | 2,56        | 6,7  | 4,14       | ???       | No portadora    | No portadora    |
| 2.677           | 0,65        | 0,82 | 0,17       | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.694           | 2,75        | 4,44 | 1,69       | Portadora | No portadora    | Portadora       |
| 2.768           | 2,53        | 1,58 | -0,96      | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.769           | 1,84        | 1,13 | -0,72      | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.771           | 3,51        | 2,26 | -1,25      | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.512           | 1,04        | 1,28 | 0,25       | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.513           | 1,21        | 1,01 | -0,21      | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.515           | 1,6         | 1,26 | -0,34      | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.516           | 1,26        | 1,79 | 0,53       | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.522           | 1,43        | 0,89 | -0,55      | Portadora | Portadora       | Portadora       |
| 2.532           | 7,36        | 7,61 | 0,26       | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.533           | 3,77        | 2,74 | -1,04      | ???       | Portadora       | Portadora       |
| 2.558           | 5,93        | 5,29 | -0,65      | ???       | Portadora       | Portadora       |

lamente cabe resaltar que hemos detectado la misma forma de la enfermedad en tres hermanos (forma no eritrodérmica) y, dado que es lógico pensar que los tres hermanos tienen similar alteración molecular, podemos sugerir que la variabilidad fenotípica encontrada en los pacientes con ictiosis laminar depende de la heterogeneidad genotípica de la misma.

#### *Análisis molecular mediante método de Southern de pacientes con ictiosis X*

La hibridación del DNA de los 26 pacientes con ictiosis X con la sonda STS PvRI.7, confirmó la ausencia de esta región genómica en todos ellos (Fig. 5). Adicionalmente, un paciente mostraba ausencia del fragmento germinal de 3.8 Kb reconocido por la sonda y, en su lugar aparecía un fragmento diferente de 7 Kb, hallazgo que se repitió en su madre y su hermana (Fig. 6). Estos resultados sugieren la presencia de una deleción parcial de la región genómica que contiene el gen de la STS, y la presencia del fragmento anómalo en la madre y la hermana indican, por una parte que ambas son heterocigotas para la deleción y, por otra, que la hermana es portadora de la enfermedad, facilitando el diagnóstico prenatal del posible déficit de STS en sus hijos en este caso.

La presencia del fragmento germinal de 3.8 Kb en dos de los pacientes con diagnóstico clínico incierto, descarta la posibilidad de que padezcan una ictiosis X.

En cuanto al análisis molecular mediante PCR de pacientes con ictiosis X, los estudios realizados revelaron la presencia de los exones 1 y 5 del gen de la STS en cinco pacientes, lo cual induce a pensar que la deleción afecta exclusivamente al extremo 3' del gen.

En consecuencia, este hecho sugiere que la presencia de deleciones parciales del gen de la STS no es infrecuente en nuestro medio y es mayor que la encontrada en otras poblaciones (19,2% en nuestro estudio frente al 10% mencionado en la literatura). Hasta el momento, en la literatura mundial sólo se hallan descrito cinco casos de portadores de deleciones parciales y 12 individuos más en los que no se pudo detectar ninguna alteración (tabla V).

Por otro lado, el estudio mediante PCR del gen de la STS en los otros dos pacientes con problemas diagnósticos desde un punto de vista clínico, permitió demostrar la ausencia del gen de la STS.

El hecho de que en todos los casos estudiados, las lesiones cutáneas, el curso clínico y su evolución en el tiempo fueran perfectamente superponibles, independientemente de la anomalía genética detectada por medio de la técnica de *Southern*, nos permite su-

**TABLA V:** CASOS DESCRITOS DE ICTIOSIS X CON DELECCIÓN PARCIAL O AUSENCIA DE ALTERACIÓN EN EL GEN DE LA STS

| Casos analizados | Delección parcial | No alteración | Autor            |
|------------------|-------------------|---------------|------------------|
| 10               | 1                 | 1             | Yen 1987         |
| 57               | 1                 | 9             | Ballabio 1989    |
| 30               | 1                 | 2             | Shapiro 1989     |
| 3                | 1                 | 0             | Nomura 1995      |
| 1                | 1                 | —             | Bernatowicz 1992 |
| 27               | 5                 | 0             | Este trabajo     |

gerir que es suficiente una alteración segmentaria del gen STS para que se produzcan las manifestaciones clínicas de la ictiosis X, las cuales no dependen de la extensión de la alteración molecular, sino de la repercusión funcional de la misma, que debe ser, por tanto, similar en todos los casos.

#### Diagnóstico molecular de mujeres portadoras de ictiosis X

El estudio estadístico mediante permitió clasificar correctamente 12 y 13 de las portadoras conocidas, según se utilice el 5% o el 1% de la sensibilidad respectivamente, lo que demuestra la elevada especificidad del test elegido por nosotros. Como resultado de nuestro estudio densitométrico, hemos detectado nueve portadoras de un total de 12 familiares estudiados (tabla IV), lo que indica una elevada proporción de mujeres portadoras dentro de la población analizada. Si, adicionalmente, incluimos las dos mujeres portadoras detectadas por medio del método de *Southern*, tenemos un total de 11 mujeres portadoras de entre las 14 analizadas (78,5% frente al 50% esperado).

Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios realizados con densitometría (25) donde se detectan tres mujeres portadoras y siete mujeres no portadoras respectivamente, de entre las 10 posibles portadoras analizadas, pero están en concordancia con los obtenidos por otros autores a través de estudios epidemiológicos (50-52). Así, Unamuno, en su tesis doctoral de 1975, encontró un mayor número de hijos enfermos de lo esperado entre los descendientes de las mujeres posibles portadoras (1/ 1,65) (50). Por otro lado, este autor también encuentra un mayor porcentaje, estadísticamente significativo (1/ 1,44), de varones enfermos entre los descendientes de mujeres portadoras. En este sentido, resulta llamativo que, tras la determinación densitométrica, en una de las familias se observen tres mujeres portadoras, un varón enfermo y solamente una mujer no portadora, descendientes de la misma mujer portadora, lo cual estaría a favor de una segregación del cromosoma X patológico por causas desconocidas. De manera similar, en otra

familia, todos los hijos descendientes de una portadora segura son portadores, enfermos o abortos.

Finalmente, en nuestro estudio incluimos como posibles portadoras a dos mujeres de la misma familia, madre e hija respectivamente de un varón enfermo (dado que en apariencia se trataba de un caso único, no podíamos clasificar a su madre como portadora segura). El hecho de que ambas mujeres se hayan clasificado como portadoras descarta que el paciente haya sufrido una alteración genética *de novo*. Por el contrario, y dado que no existen otros antecedentes familiares, es posible que la alteración haya aparecido por primera vez en la madre. Algo similar puede decirse de una familia más, con un único varón afectado (Fig. 6), ya que la madre ha resultado tener, por densitometría, igual alteración genética que su hijo enfermo.

La validación definitiva de nuestros resultados solamente puede venir dada, en un futuro, por la constatación de hijos enfermos en las mujeres clasificadas como portadoras en nuestro estudio.

#### Estudio molecular de pacientes diagnosticados de ictiosis laminar

Dado que la ictiosis laminar es un trastorno genéticamente heterogéneo, se ha analizado, en los ocho pacientes diagnosticados de ictiosis laminar, la organización de diferentes genes implicados en el desarrollo de la capa córnea de la epidermis, como son los genes que codifican la involucrina y la filagrina. El hecho de que no se hayan detectado alteraciones genéticas mediante método de *Southern*, descarta que la enfermedad sea debida a anomalías en la organización macroestructural de estos genes. Por otra parte, el análisis mediante PCR-SSCP de los exones 2 y 3 del gen de la transglutaminasa epidérmica en estos mismos pacientes, tampoco reveló ninguna mutación genética, mientras que el estudio por PCR-CFLP permitió caracterizar tres casos con un fragmento ausente tanto en el resto como en el DNA control, lo que sugiere la existencia de una mutación en estos pacientes a nivel de uno de estos dos exones.

## CONCLUSIONES

El gen de la STS se encuentra alterado, por delección total o parcial, en todos los casos de ictiosis X estudiados, constatándose que la amplificación mediante PCR de los exones del gen de la STS resulta un método rápido y específico en el diagnóstico de ictiosis X. En cuanto a la detección de portadoras de ictiosis X, nuestros resultados sugieren que el análisis mediante densitometría puede ser considerado como un fiable método diagnóstico. En relación con la ictiosis laminar, el análisis molecular ha permitido descartar alteraciones macroestructurales en los genes que codifican la filagrina y la involucrina, y confirma que se trata de una entidad genéticamente heterogénea.

**Abstract.**—*Background:* Since 1978, it is known that X-linked ichthyosis is related to a deficit in steroid sulfatase enzyme (STS). Clonation and characterization of STS gene have made easier X-linked ichthyosis studies. On the other hand, epidermal transglutaminase (epidermal TGase) gene was recently found to be the disease-cause gene in lamellar ichthyosis, but some cases with no alterations at the epidermal TGase locus and some others patients with different genetic abnormalities other than epidermal TGase gen have also been described.

*Objetives:* We have analyzed molecular aspects of STS gene in 26 patients suffering from X-linked ichthyosis, and we have tried to find a method to detect female carriers of such a disease. Finally, we have studied the genes encoding for involucrin and filaggrin proteins in patients with recessive lamellar ichthyosis, as well as the exons 2 and 3 of epidermal transglutaminase enzyme.

*Results:* Genomic DNA was isolated from peripheral leucocytes in all affected individuals. 26 patients of X-linked ichthyosis were analyzed by Southern blot technique and PCR, and gene dosage analysis was performed on 25 females belonging to X-linked ichthyosis families, including 12 obligate carriers and 12 potential heterozygotes. DNA from individuals with recessive lamellar ichthyosis was studied by Southern blot, PCR-SSCP and PCR-CFLP techniques.

*Results:* STS was totally or partially deleted in all studied patients with X-linked ichthyosis. Gene dosage analysis of genomic DNA of women belonging to X-linked ichthyosis families classified as obligate carriers 9 out to 12 potential heterozygotes. Finally, 3 patients with recessive lamellar ichthyosis were seen to have genetic abnormalities in epidermal transglutaminase exons 2 and 3.

*Hernández Martín A. Molecular study of X-linked ichthyosis and recessive lamellar ichthyosis. Actas Dermosifiliogr. 1999;90:81-93.*

**Key words:** X-Linked ichthyosis. Steroid sulfatase. Lamellar ichthyosis. Involucrin. Filaggrin. Epidermal transglutaminase.

NOTA: Después de la finalización de este trabajo, se han descrito cuatro nuevas mutaciones en el gen de la STS por Mosita y cols. (J Invest Dermatol 1997; 109:244-5) y Alperin y cols. (J Biol Chem 1997;272: 20756-63).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wells RS, Jennings MC. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris. JAMA 1967;202:485-8.
2. Shapiro LJ, Weiss R, Webster D, France JT. X-linked ichthyosis due to steroid-sulfatase deficiency. Lancet 1978; 24:70-2.
3. Koppe JG, Marinkovic-Ilsen A, Rijken Y, De Groot WP, Jobst AC. X-linked ichthyosis. Arch Dis Child 1978;53:803-6.
4. Unamuno P, Santos C. Diagnóstico de laboratorio de la ictiosis X. Piel 1991;6:80-3.
5. Williams ML. Lipids in normal and pathological desquamation. Adv Lipid Res 1991;24:211-62.
6. Mohandas TK, Shapiro LJ, Sparkes R, Sparkes MC. Regional assignment of the steroid sulfatase-X-linked ichthyosis locus: implications for a non-inactivated region on the short arm of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci 1979;76:5779-83.
7. Tiepolo L, Zuffardi O, Fraccaro M, di Natale D, Gargantini L, Müller CR, Ropers HH. Assignment by deletion mapping of the steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to Xp 22.3. Hum Genet 1980;54:205-6.
8. Fraser N, Ballabio A, Zollo M, Persico G, Cmig J. Identification of incomplete coding sequences for steroid sulfatase on the human Y chromosome: evidence for an ancestral pseudoautosomal gene? Development 1987;101 (suppl):127-32.
9. Yén PH, Marsh B, Allen E, Tasi SP, Ellison J, Connolly L, Neiswanger K, Shapiro LJ. The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene: evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. Cell 1988;55:1123-35.
10. Ballabio A, Anier JE, Chamberlain JS, Zollo M, Caskey CT. Screening for steroid sulfatase gene deletions by multiplex DNA amplification. Hum Genet 1990;84:571-3.
11. Shapiro LJ, Yén P, Pomerantz D, Martin E, Rolewic L, Mohandas T. Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus. Proc Natl Acad Sci 1989;86:8472-81.
12. Yén PH, Allen E, Marsh B, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y exchange. Cell 1987;49: 443-54.
13. Bonifas JM, Morley BJ, Okey RE, Wai Kan Y, Epstein EH Jr. Cloning of a cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with X recessive

- chromosome-linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84: 9248-51.
14. Conary J, Lorkowski G, Schmidt B, Pohlmann R, Nagel G, Meyer HE, Krentler C, Cully J, Hasilik A, Von Figura K. Genetic heterogeneity of steroid sulfatase deficiency revealed with cDNA for human steroid sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144:1010-17.
  15. Guillard EF, Affara NA, Yates JRX, Goudie DR, Lambert J, Aitken DA, Ferguson-Smith MA. Deletion of a DNA sequence in eight of nine families with X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency). *Nucleic Acids Res* 1987;15:3977-85.
  16. Paige DG, Emilion GG, Bouloux PMG, Harper JJ. A clinical and genetic study of X-linked recessive ichthyosis and contiguous gene defects. *Br J Dermatol* 1994;131:622-9.
  17. Ballabio A, Carozzo R, Parenti G, Gil A, Zollo M, Persico M, Gillard E, Affara N, Yates J, Ferguson-Smith MA, Frants RR, Eriksson AW, Andria G. Molecular heterogeneity of steroid sulfatase deficiency: a multicenter study on 57 unrelated patients, at DNA and protein levels. *Genomics* 1989;4:36-40.
  18. Bernatowicz LF, Li XM, Carozzo R, Ballabio A, Mohnadas T, Yen PH, Shapiro LJ. Sequence analysis of a partial deletion of the human steroid sulfatase gene reveals 3 bp of homology at deletion breakpoints. *Genomics* 1992;13:892-3.
  19. Nomura K, Nakano H, Umeki K, Harada K, Kon A, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto I. A study of the steroid sulfatase gene in families with X-linked ichthyosis using polymerase chain reaction. *Acta Derm Vener (Stockh)* 1995;75:340-2.
  20. Likkesfeldt G, Bennett P, Lykkesfeldt AE, Micic S, Moller S, Svenstrup B. Abnormal androgen and oestrogen metabolism in men with steroid sulphatase deficiency and recessive X-linked ichthyosis. *Clin Endocrinol* 1985;23: 385-93.
  21. Martin ES, Yen P, Shapiro LJ. A splice junction mutation in a patient with X-linked ichthyosis and steroid sulfatase deficiency. *Am J Hum Genet* 1990;47:A228.
  22. Basler E, Grompe M, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutations in the steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis. *Am J Hum Genet* 1992;50:483-91.
  23. Robledo R, Melis P, Schillinger E, Casciano I, Balazs I, Rinaldi A, Siniscalco M, Pilippi G. X-linked ichthyosis without STS deficiency. Clinical, genetical and molecular studies. *Am J Med Gen* 1995;59:143-8.
  24. Lebo RV, Lynch ED, Golbus MS, Flandermeyer RR, Yen PH, Shapiro LJ. Prenatal in situ hybridization test for deleted steroid sulfatase gene. *Am J Med Genet* 1993;46: 652-8.
  25. Bonifas JM, Ervin AB, Epstein Jr EH. Detection of carriers for X-linked ichthyosis by Southern blot analysis and identification of one family with a *de novo* mutation. *J Invest Dermatol* 1990;95:16-9.
  26. Traupe H. The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counseling, and therapy. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1989d: p. 111-34.
  27. Unamuno P. *Piel* 1987;2:9-21.
  28. Larregue M, Ottavy N, Bressieux JM, Lorette J. Bébécollodion: trente-deux nouvelles observations. *Ann Dermatol Venerol* 1986;113:773-85.
  29. Traupe H. Clinical and genetic features of the lamellar ichthyosis: evidence for three different types. En: Happle R, Grosshans E, eds. *Pediatric Dermatology. Advances in diagnosis and treatment*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1987: p. 30-40.
  30. Bernhardt M, Baden HP. Report of a family with an unusual expression of recessive ichthyosis. Review of 42 cases. *Arch Dermatol* 1986;122:428-33.
  31. Frost P, Van Scott EJ. Ichthyosiform dermatoses. Classification based on anatomic and biometric observations. *Arch Dermatol* 1966;94:113-26.
  32. Kanitakis J, Ramírez-Bosca A, Reano A, Viac J, Roche P, Thivolet J. Filaggrin expression in normal and pathological skin. A marker of keratinocyte differentiation. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 1988;412:375-82.
  33. Peña Penabad C. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, 1995.
  34. Gerritsen MJ, Van de Kerkhof P, Van Vlijmen-Willems I, Steijlen P. Expression of filaggrin, involucrin and tenascin in monogenic disorders of keratinization. *Eur J Dermatol* 1977;7:164-8.
  35. Hohl D, Huber M, Frenk E. Analysis of the cornified cell envelope in lamellar ichthyosis. *Arch Dermatol* 1993;129: 618-24.
  36. Lavrijsen AP, Maruyama T. Absent transglutaminase TGK expression in two of three patients with lamellar ichthyosis. *Arch Dermatol* 1995;131:363-4.
  37. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional crosslinking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 1991;5:3071-77.
  38. Tacher SM, Rice RH. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 1985;40:685-95.
  39. Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SPM, Ponc M, Bon A, Lautenschlager S, Schorderet DF, Hohl D. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995;267:525-8.
  40. Russell LJ, DiGiovanna JJ, Hashem N, Compton JG, Bale SJ. Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q. *Am J Human Genet* 1994;55:1146-52.
  41. Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, Steinert PM, Hashem N, Compton JG, Bale SJ. Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Gen* 1995;9:279-83.
  42. Parmentier L, Blanchet-Bardon C, Nguyen S, Prud'homme JF, Dubertret L, Weissenbach J. Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Gen* 1995;4:1391-5.
  43. Russell LJ, Whyte YM, DiGiovanna JJ, Hashem M, Bale SJ, Compton JG. The molecular basis of autosomal recessive ichthyosis: mutations in the transglutaminase 1 gene. *Am J Hum Genet* 1995;57:226A.
  44. Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Wyss M, Hohl D. Lamellar ichthyosis is genetically heterogeneous. Cases with

- normal keratinocyte transglutaminase. *J Invest Dermatol* 1995;105:653-4.
45. Bale SJ, Russell LJ, Lee ML, Compton JG, DiGiovanna JJ. Congenital recessive ichthyosis unlinked to loci for epidermal transglutaminases. *J Invest Dermatol* 1996;107:808-11.
46. Parmentier L, Lakhdar H, Blanchet-Bardon C, Marchand S, Dubertret L, Weissenbach J. Mapping of a second locus for lamellar ichthyosis to chromosome 2q33-35. *Hum Mol Gen* 1996;5:555-9.
47. Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *Br Med J* 1966;1:947-50.
48. Unamuno P, Martín-Pascual A, García-Pérez A. X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol* 1977;97:53-8.
49. García-Bravo B, Unamuno P. Ictiosis X. *Monografías de Dermatología* 1991;1:27-37.
50. Unamuno P. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, 1975.
51. Went LN, Groot WP, Sanger R, Tippett P, Gavin J. X-linked ichthyosis: linkage relationship with the Xg blood groups and other studies in a large Dutch kindred. *Ann Hum Genet* 1969;32:333-45.
52. Saita B, Kikuchi I, Hiekima M, Inone S, Fokuzaki M. X-linked ichthyosis: five families in Southern kyushu. *J Derm* 1980;7:271-6.