



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR

TESiS DOCToRAL

**APROXiMACiÓN GENÉTICA AL
ESTVDiO DE LAS iCTiOSiS**

SARA CIRIA ABAD

DIRECTOR

DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO

2013



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR

TESiS DOCToRAL

APROXiMACiÓN GENÉTICA AL
ESTVDiO DE LAS iCTiOSiS

Memoria presentada por Dña. Sara Ciria Abad para optar al grado de Doctora.

Fdo.: Sara Ciria Abad

2013

EL DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “*APROXIMACIÓN GENÉTICA AL ESTUDIO DE LAS ICTIOSIS*”, que presenta la licenciada en biología Dña. Sara Ciria Abad ha sido realizado bajo mi dirección en la unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca a 25 de JUNIO de 2013.

Fdo.: Dr. Rogelio González Sarmiento

Son muchas las personas a las que agradecer su ayuda por la implicación directa que han tenido en la realización de este trabajo:

Al Profesor Doctor Rogelio González Sarmiento, por el gran grupo de trabajo que ha construido, en el cual he tenido la oportunidad de aprender y crecer como profesional y como persona. Al Profesor Doctor Pablo de Unamuno Pérez, con quien comenzamos el proyecto de estudio de las ictiosis, por su dedicación.

A todos los compañeros del laboratorio de medicina y del laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer; en especial a Laura, Nerea, Elena, Irene, Nieves, Laurita, Mercedes y Estrella, por su compañerismo, por la complicidad con la que disfrutábamos del trabajo y por ofrecerme siempre su ayuda incondicional. A Elena Bueno, por gestionar los últimos pacientes del estudio y a Javier Cañueto, por su implicación en la búsqueda de los datos clínicos.

A mis amigas Virginia y Alba, para las que no tengo palabras suficientes de agradecimiento, por la ayuda que me han brindado y como no, por su amistad. A Virginia, por ser una buena amiga y una buena persona. A Alba, por su calidad profesional y sobre todo por su calidad humana.

A mis amigos Lorena y Juan, por acogerme en su hogar salmantino en cada una de mis visitas, por su constante interés en el avance de este trabajo y por estar siempre ahí. A Julián y Judith, por sus ánimos y compañía maña.

A mi familia, que me apoya desde el principio en cada una de mis decisiones, porque son para mí el mejor ejemplo a seguir, GRACIAS POR TODO.

íNDiCE



1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LAS ICTIOSIS	5
1.2 ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS	10
Epidemiología	10
Manifestaciones clínicas	11
Genética	17
Tratamiento	19
1.3 ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS	20
Estrato basal	20
Estrato de células espinosas	21
Estrato granuloso	22
Estrato lúcido o de transición	22
Estrato córneo	23
1.4 CAPA CÓRNEA. COMPONENTES ESTRUCTURALES	24
1.5 TRANSGLUTAMINASAS	26
Transglutaminasa 1	29
1.6 GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO O TRANSPORTE DE LÍPIDOS	42
<i>ABCA12</i>	42
<i>ALOX12B</i> y <i>ALOXE3</i>	45
<i>NIPAL4</i>	48
<i>CYP4F22</i>	50

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	57
Pacientes.....	57
Controles	60
3.2 ANÁLISIS MOLECULAR.....	61
Extracción de ADN.....	61
Amplificación de ADN	63
Electroforesis en gel de agarosa	70
Análisis de heterodúplex	71
DHPLC.....	74
Purificación de los fragmentos amplificados	77
Secuenciación automática	77
Análisis informático de las secuencias.....	79
Estudio <i>in silico</i>	79
4. RESULTADOS.....	85
4.1 ANÁLISIS DEL GEN <i>TGM1</i>	85
Caso 2371	87
Caso 2399	89
Caso 2527	91
Caso 17596.....	92
Caso 19848.....	96

Caso 20503.....	98
Caso 21189.....	99
Caso 22223.....	101
Caso 24040.....	102
Caso 24041.....	104
Caso 25459.....	106
Caso 26040.....	108
4.2 ANÁLISIS DEL GEN <i>ALOX12B</i>	113
Caso 6413.....	114
Caso 17034.....	115
Caso 17199.....	117
Caso 23100.....	118
Caso 23698.....	120
Caso 26179.....	123
4.3 ANÁLISIS DEL GEN <i>ALOXE3</i>	127
Caso 2359.....	127
4.4 ANÁLISIS DEL GEN <i>NIPALA</i>	130
Caso 17272.....	130
4.5 ANÁLISIS DEL GEN <i>CYP4F22</i>	133
Caso 21275.....	133
Caso 22223.....	136
Caso 24027.....	137

5. DISCUSIÓN.....	141
5.1 ESTUDIO DEL GEN <i>TGM1</i>	141
Casos con una mutación en homocigosis	142
Casos con una mutación en heterocigosis	144
Casos con dos mutaciones en heterocigosis	146
5.2 ESTUDIO DEL GEN <i>ALOX12B</i>	153
Casos con una mutación en homocigosis	153
Casos con dos mutaciones en heterocigosis	155
5.3 ESTUDIO DEL GEN <i>ALOXE3</i>	157
5.4 ESTUDIO DEL GEN <i>NIPAL4</i>	158
5.5 ESTUDIO DEL GEN <i>CYP4F22</i>	159
5.6 ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	162
6. CONCLUSIONES.....	167
7. ABREVIATURAS.....	171
8. BIBLIOGRAFÍA	179

íNTRODVCCiÓN



1. INTRODUCCIÓN

Las ictiosis son un grupo de enfermedades cutáneas relativamente frecuentes, que aunque no son, en general, procesos que alteran a la vida, ocasionan importantes problemas estéticos y afectan a la calidad de vida de los pacientes. Las ictiosis son trastornos genéticos, heredados según patrones mendelianos, en los que están implicados genes que codifican proteínas estructurales de la capa córnea de la epidermis o proteínas implicadas en el metabolismo o transporte de lípidos. En algunos casos el defecto genético, así como la secuencia fisiopatológica que ligam el trastorno genético con las manifestaciones clínicas, están bien caracterizados; por ejemplo, en la ictiosis recesiva ligada al cromosoma X; sin embargo, en otros casos no existen datos suficientes para explicarlas.

Las ictiosis se caracterizan clínicamente por presentar escamas visibles que adoptan diferentes patrones de distribución, pudiendo ser localizadas o generalizadas, e histológicamente por hiperqueratosis que suele estar asociada con alguna alteración epidérmica. En algunas variantes de la enfermedad se puede observar paraqueratosis, queratosis pilosa y atrofia de las glándulas anejas.

La gravedad de las ictiosis oscila desde una sequedad y descamación leve a una sequedad grave con hiperqueratosis que puede llegar a ser desfigurante.

Este trabajo doctoral se diseñó con el objetivo de caracterizar defectos genéticos en los genes *TGM1*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*, en pacientes diagnosticados de ictiosis congénita autosómica recesiva y relacionarlos con los datos clínicos de la enfermedad.

En esta introducción, inicialmente se definirá el concepto de ictiosis y su clasificación, señalando posteriormente las características clínicas específicas de los distintos tipos de ictiosis congénitas autosómicas recesivas. En un siguiente apartado se revisará de forma global la estructura general de la epidermis, especialmente de la capa córnea, las proteínas que la forman, las enzimas implicadas en su formación, especialmente la proteína transglutaminasa 1 y aquellas que participan en el metabolismo y transporte de lípidos.

1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LAS ICTIOSIS

La epidermis, que proporciona una “barrera” esencial con el medio ambiente, 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. Alteraciones internas o externas que desestabilicen este equilibrio debilitan esta función de “barrera” [1, 2].

El término “ictiosis”, introducido por primera vez en los textos de dermatología por Willam en 1808 [3], deriva de la raíz griega *ichthys* que significa pez y fue usado para designar a todas aquellas enfermedades que cursaban con una descamación generalizada de la piel. Anteriormente, en el año 1731, John Machin de la *Royal Society* de Londres presentó por primera vez un caso clínico de un paciente afecto de ictiosis hystrix. A principios de los años 20, científicos europeos definieron la queratinización de la epidermis en la ictiosis y comenzaron a desarrollar ideas innovadoras en el enfoque de la histología y la ultraestructura de la piel. Los términos de ictiosis laminar y de hiperqueratosis epidermolítica, entre otros, fueron utilizados por primera vez en 1966 por un grupo de científicos estadounidenses que trabajaban en el estudio de la proliferación de la hiperqueratosis que presentaban estos pacientes [4].

El comienzo de la era molecular puede atribuirse a los estudios de 1978 de la deficiencia de la sulfatasa esteroidea en pacientes con ictiosis recesiva ligada al cromosoma X [5].

Las ictiosis son un grupo de enfermedades que producen escamas visibles en toda o gran parte de la piel debido a desórdenes 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.

La clasificación de las ictiosis ha experimentado numerosas modificaciones a lo largo del pasado siglo. Una de las clasificaciones más utilizada se basaba en la forma de transmisión genética, distinguiéndose tres tipos principales: ictiosis autosómicas dominantes, autosómicas recesivas e ictiosis ligadas al cromosoma X [6]. Sin embargo, una de las clasificaciones de referencia, aunque menos utilizada en la práctica, es la de Traupe [7], basada en dos criterios fundamentales: la edad de aparición del trastorno cutáneo (denominándose congénitas a aquellas en las que aparece en el momento del nacimiento y vulgares a las que éste aparece posteriormente a lo largo de la vida) y la presencia o no de anomalías extracutáneas asociadas.

Las ictiosis hereditarias pertenecen a un amplio grupo clínica y etiológicamente heterogéneo de trastornos de la cornificación [8]. Durante años se ha realizado un gran esfuerzo por definir sus causas moleculares y establecer una correlación entre genotipo y fenotipo [2, 9].

Sin embargo, hasta el año 2009, no existía una terminología y clasificación universalmente aceptadas de las enfermedades consideradas bajo el término genérico de ictiosis; entre otras razones porque estos términos varían considerablemente entre europeos, asiáticos y norteamericanos; por ejemplo, la misma entidad clínica puede ser denominada hiperqueratosis epidermolítica, eritrodermia ictiosiforme congénita ampollosa o ictiosis ampollosa, dependiendo del lugar donde se diagnostique [10].

El proyecto para unificar la clasificación de las ictiosis comenzó en la 1ª Conferencia Mundial sobre Ictiosis celebrada en Alemania en el año 2007, donde un equipo de expertos clínicos, patólogos, biólogos y genetistas comenzaron un debate que llevó a la celebración de la 1ª Conferencia Consenso sobre Ictiosis, que tuvo lugar en Francia en el año 2009, donde se debatió hasta llegar a un acuerdo [11].

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 acceso al estudio genético, de microscopía o al análisis ultraestructural pueden verse obstaculizados por el alto coste. La edad de aparición de la enfermedad, no se ha elegido como criterio importante de clasificación, debido a la gran variabilidad de la presentación inicial de algunas ictiosis.

La división principal distingue dos grandes grupos, formas sindrómicas y formas no sindrómicas. La clasificación propuesta se resume en las siguientes tablas (tablas 1 y 2):

Tabla 1. Clasificación de las ictiosis hereditarias I. Formas no sindrómicas [11].

	Herencia	Genes
ICTIOSIS COMUNES		
Ictiosis vulgar	AD	<i>FLG</i>
Ictiosis recesiva ligada al cromosoma X	XR	<i>STS</i>
ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS		
Tipos principales		
Ictiosis arlequín	AR	<i>ABCA12</i>
Ictiosis laminar	AR	<i>TGM1, NIPAL4, ALOX12B, ALOXE3, ABCA12</i>
Eritrodermia ictiosiforme congénita	AR	<i>ALOXE3, ALOX12B, ABCA12, CYP4F22, NIPAL4, TGM1</i>
Otras variantes		
Bebé colodión autorresolutivo	AR	<i>TGM1, ALOX12B, ALOXE3</i>
Bebé colodión autorresolutivo acral	AR	<i>TGM1</i>
Ictiosis en traje de baño	AR	<i>TGM1</i>
ICTIOSIS QUERATINOPÁTICAS		
Tipos principales		
Ictiosis epidermolítica	AD	<i>KRT1, KRT10</i>
Ictiosis epidermolítica superficial	AD	<i>KRT2</i>
Otras variantes		
Ictiosis epidermolítica anular	AD	<i>KRT1, KRT10</i>
Ictiosis de Curth-Macklin	AD	<i>KRT1</i>
Ictiosis epidermolítica autosómica recesiva	AR	<i>KRT10</i>
Nevus epidermolítico	Mutaciones somáticas	<i>KRT1/KRT10</i>
OTRAS FORMAS		
Queratodermia loricrina	AD	Locus desconocido
Eritroqueratodermia variabilis	AD	<i>GJB3, GJB4</i>
Síndrome de la piel exfoliada	AR	Locus desconocido
Eritrodermia ictiosiforme reticular congénita	AD	Locus desconocido
Síndrome KCLICK	AR	<i>POMP</i>

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; XR: ligada al cromosoma X recesiva.

Tabla 2. Clasificación de las ictiosis hereditarias II. Formas sindrómicas [11].

	Herencia	Genes
ICTIOSIS SINDRÓMICAS LIGADAS AL CROMOSOMA X		
Ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (sindrómica)	XR	<i>STS</i> /genes contiguos
Ictiosis folicular-atriquia-fotofobia (síndrome IFAP)	XR	<i>MBTPS2</i>
Síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (condrodisplasia puntacta 2)	XD	<i>EBP</i>
ICTIOSIS SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS		
Trastornos del pelo		
Síndrome de Netherton	AR	<i>SPINK5</i>
Síndrome ictiosis-hipotricosis	AR	<i>ST14</i>
Síndrome ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante	AR	<i>CLDN1</i>
Tricotiodistrofia	AR	<i>ERCC2/XPD, ERCC3/XPB, GTF2H5/TTDA</i>
Trastornos neurológicos		
Síndrome de Sjögren-Larsson	AR	<i>ALDH3A2</i>
Síndrome de Refsum	AR	<i>PHYH/PEX7</i>
Síndrome MEDNIK	AR	<i>AP1S1</i>
Curso de la enfermedad letal		
Síndrome de Gaucher tipo 2	AR	<i>GBA</i>
Déficit múltiple de sulfatasas	AR	<i>SUMF1</i>
Síndrome de CEDNIK	AR	<i>SNAP29</i>
Síndrome ARC	AR	<i>VPS33B</i>
Otros signos asociados		
Síndrome KID	AD	<i>GJB2 (GJB6)</i>
Síndrome de Chanarin-Dorfman	AR	<i>ABHD5</i>
Síndrome de ictiosis-prematuridad	AR	<i>SLC27A4</i>

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; XR: ligada al cromosoma X recesiva; XD: ligada al cromosoma X dominante.

1.2 ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS

EPIDEMIOLOGÍA

Las ictiosis congénitas autosómicas recesivas (ICAR) aparecen en todo el mundo con una prevalencia estimada de 1:300.000 nacimientos. Según la *Fundation for Ichthyosis and Related Skin Types* afectan a 1:200.000 individuos en los Estados Unidos. Esta prevalencia puede ser mayor en algunas regiones como es el caso de Noruega, donde se estima la aparición de ICAR en 1:91.000 [12]; este aumento en la prevalencia puede ser causado por la alta tasa de endogamia o como revela un estudio realizado en nuestro país, concretamente sobre población gallega, que estima esta aparición en 1:122.000 nacimientos, debido a la existencia de mutaciones fundadoras [13].

El hallazgo de una o varias mutaciones recurrentes en una población puede deberse a que dicha mutación se haya producido en un momento determinado de la historia y después haya pasado de generación en generación (mutación fundadora), o que la región del genoma en donde se encuentra presente una secuencia de ADN propensa a mutar [14].

En España se ha estimado una prevalencia de ICAR de 1:138.000 en la población general y de 1:61.700 en la población menor de 10 años [15]. En determinadas regiones la prevalencia podría ser mayor. En la zona costera de Galicia alcanzaría el 1:33.000 debido a la existencia de un efecto fundador [16]. No se han descrito diferencias entre ambos sexos ni variaciones apreciables dependiendo de la raza o condición social.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La clasificación actual de las ictiosis distingue 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.

Clásicamente en el grupo de las ICAR se distinguían únicamente dos trastornos: la ictiosis laminar (IL) y la eritrodermia ictiosiforme congénita (EIC) [17, 18]. Actualmente se incluyen también la ictiosis arlequín, el bebé colodión autorresolutivo, el bebé colodión autorresolutivo acral y la ictiosis en traje de baño.

A continuación se detallan brevemente las características clínicas de las entidades que forman el grupo de las ICAR.

ICTIOSIS ARLEQUÍN

La ictiosis arlequín o feto arlequín es la forma más grave de ICAR, a menudo letal en el periodo neonatal. El neonato, frecuentemente prematuro, presenta grandes placas hiperqueratósicas separadas por fisuras profundas, que cubren toda la superficie de la piel [19] (figura 1).

La tirantez de la piel resulta en una marcada eversión de los párpados (ectropión) y de los labios (eclabión); desarrollo rudimentario de los cartílagos auriculares y nasales, y en ocasiones, microcefalia [20].



Figura 1. Bebé afecto de ictiosis arlequín [19].

No suelen tener pestañas ni cejas, aunque el pelo del cuero cabelludo puede estar conservado. Las manos y los pies están hinchados y edematosos, frecuentemente cubiertos por una coraza a modo de guante. Pueden presentar contracturas de los dedos.

La ventilación pulmonar está comprometida, las pérdidas transepidérmicas de agua conducen a la deshidratación, al desequilibrio hidroelectrolítico y a la inestabilidad térmica, y el riesgo de infecciones está aumentado. La tirantez facial y el eclabión dificultan la succión, y por tanto, la alimentación del recién nacido, agravando la deshidratación [21].

ICTIOSIS LAMINAR

La ictiosis laminar, de herencia autosómica recesiva, 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.

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 laminar.

Los niños nacen habitualmente prematuros, con una piel eritematosa (rojiza), dura y translúcida, que los envuelve por completo, denominada membrana colodión.

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 2) [22]. Esta dura envoltura puede causar dificultad respiratoria por constricción torácica y abdominal [23]; además las pérdidas transepidérmicas de agua y el riesgo de infección son muy elevadas.



Figura 2. Bebé colodión en la etapa en la que ha perdido el recubrimiento córneo y piernas de un paciente adulto afecto de IL.

En edad adulta, la ictiosis laminar se caracteriza por la presencia de escamas grandes y oscuras que cubren toda la superficie de la piel (figura 2). Es habitual que exista en los fenotipos más graves ectropión y eclabión; alopecia cicatricial, especialmente en la periferia del cuero cabelludo; hipoplasia de los cartílagos auriculares y nasales; y queratodermia palmar y plantar [24].

ERITRODERMIA ICTIOSIFORME CONGÉNITA

La eritrodermia ictiosiforme congénita es el tipo más frecuente de ictiosis congénita autosómica recesiva. Los pacientes afectados tienen habitualmente un cuadro clínico menos severo que los pacientes con IL.

A diferencia de la ictiosis laminar, la EIC, se caracteriza por una destacada eritrodermia y escamas superficiales semi-adherentes finas y blanquecinas que en los casos más leves, suelen mejorar con la edad (figura 3) [25]. Al igual que en la IL, la mayoría de los pacientes nacen como bebé colodión. En edad adulta, los pacientes desarrollan una grave queratodermia palmar y plantar. Es frecuente la presencia de ectropión y eclabión.



Figura 3. Fenotipo clásico de eritrodermia ictiosiforme congénita [11, 26].

Tanto en la IL como en la EIC es frecuente la hipohidrosis, la intolerancia severa al calor y la distrofia ungueal [27].

La naturaleza de las escamas y el grado o intensidad de la eritrodermia son dos de las características clínicas principales para distinguir entre IL y EIC; sin embargo, existe un número considerable de casos que presentan fenotipos

intermedios, lo que dificulta el diagnóstico y la clasificación, en parte porque el cuadro clínico es, en muchas ocasiones, variable dependiendo de la edad del paciente; porque el fenotipo puede ser diferente entre miembros de la misma familia [26]; o bien porque en el mismo paciente se distinguen características fenotípicas que comparten los dos grupos clínicos.

BEBÉ COLODIÓN AUTORRESOLUTIVO

No sólo la IL y la EIC pueden manifestarse como bebé colodión, otras enfermedades también pueden hacerlo ocasionalmente, como es el caso del síndrome de Sjögren-Larsson, la Tricotiodistrofia, la enfermedad de Gaucher infantil, la enfermedad por almacenamiento de lípidos neutros, el síndrome de Conradi-Hünemann-Happle, el síndrome de Hay-Wells y las displasias ectodérmicas [28-31]. En el 10-24% de los neonatos la membrana desaparece espontáneamente y deja la piel totalmente normal; estos casos se conocen en la actualidad como bebés colodión autorresolutivos (BCA) [32], aunque algunos autores proponen hablar de bebé colodión con auto-mejoría, porque en muchos pacientes, cuando son reexaminados en la juventud o en edad adulta presentan un grado variable de anhidrosis e intolerancia al calor y signos leves de ictiosis, como xerosis y descamación fina, especialmente en las axilas y el cuello (figura 4) [33].

Aunque el bebé colodión es un cuadro generalizado, se han descrito casos localizados a nivel acral; en 1952 se describió a un paciente con membrana colodión que afectaba exclusivamente a las manos y los pies y que siguió un curso autorresolutivo [34]. Recientemente se ha descrito un nuevo caso con estas características [35].



Figura 4. Bebé colodión autorresolutivo en sus primeras horas de vida, a los diez días y a los cuatro meses de edad [36].

ICTIOSIS EN TRAJE DE BAÑO

Aunque previamente se habían descrito casos de ictiosis de distribución peculiar [37-39], en el año 2005 se describió la ictiosis en traje de baño (ITB) como una variedad independiente de ICAR.

Los pacientes afectados presentan al nacimiento una membrana colodión generalizada. Cuando esta se desprende se observa una distribución característica de las escamas con afectación del tronco, la zona proximal de las extremidades superiores, incluyendo la axila; el cuello y el cuero cabelludo. La zona central de la cara, las extremidades y el área lumbar suprarrenal están respetadas [40-42]. Las escamas son grandes, laminares y oscuras. Las palmas y las plantas presentan leve hiperqueratosis difusa. El dorso de las manos y de los pies, y las uñas no están alterados (figura 5).

Se ha detectado mayoritariamente en pacientes de origen sudafricano, pero también en individuos procedentes de Europa y de países del Mediterráneo [43].



Figura 5. Bebé afecto de ictiosis en traje de baño a los dos días de vida, a los 15 días y a los 6 meses de edad [40].

GENÉTICA

En 1994, Russell y colaboradores localizaron el defecto genético causante de la ictiosis laminar en el cromosoma 14 [44], más concretamente en la posición 14q11, en el locus *TGM1*, que codifica la enzima transglutaminasa 1 y, seguidamente, se identificaron las primeras mutaciones en el gen asociadas a la enfermedad [45, 46].

No sólo en pacientes con IL se detectan mutaciones en *TGM1*, también los pacientes con EIC y con variantes menos frecuentes de ICAR portan alteraciones en este gen. Desde esta fecha se han descrito numerosas mutaciones en pacientes de diversos orígenes [35, 38, 42, 47-60]. Aproximadamente en el 30-40% de los pacientes diagnosticados de ICAR se detectan mutaciones en el gen *TGM1*.

En 1996 se asoció un segundo locus, localizado en el cromosoma 2q33-35, concretamente en el gen *ABCA12*, que codifica una proteína implicada en el transporte de lípidos [61, 62]. En el año 2003, se identificaron las primeras mutaciones en pacientes con IL. Posteriormente se confirmó que las mutaciones en este gen también eran responsables de la ictiosis arlequín [19, 20, 63, 64].

La existencia de familias sin alteraciones en estos dos genes hizo pensar en otros genes candidatos causantes de la enfermedad, considerándose a las ICAR como entidades genéticamente heterogéneas [65]. Así mismo, mediante análisis de ligamiento, se han ido asociando paulatinamente una serie de regiones cromosómicas con la aparición de la enfermedad: en el año 2000, los cromosomas 19 (19p12-12 y 19p13.1-p13.2) y 3 (3p21), cuyos genes quedaron sin determinar [66, 67]; en 2001, el cromosoma 17 (17p13), asociado a los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos [68, 69]; en 2004, el cromosoma 5 (5q33), asociado al gen *NIPAL4*, también conocido como *ICHTHYIN* [70]; en 2005, el cromosoma 12 (12p11.2-q13) [71]; en 2006, el cromosoma 9, concretamente en el gen *FLJ39501* llamado también *CYP4F22* [72]; en 2011, el cromosoma 10, asociado al gen *LIPN* [73]; y finalmente, en el año 2012, el cromosoma 6, al gen *PNPLA1* [74].

Hasta el momento, se han identificado mutaciones patogénicas en pacientes con ICAR en los genes, *TGM1*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4*, *CYP4F22* y *ABCA12*. En un estudio realizado en el año 2009 en 520 familias con ICAR se detectaron mutaciones en alguno de estos genes en el 78% de ellas (32% en *TGM1*, 16% en *NIPAL4*, 12% en *ALOX12B*, 8% en *CYP4F22*, 5% en *ALOXE3* y 5% en *ABCA12*) [75]. En otro estudio de 250 pacientes con ICAR de distintos orígenes el 38% presentaba mutaciones en *TGM1*, el 6,8% en *ALOX12B* y el 6,8% en *ALOXE3* [76]. En un trabajo realizado en Galicia en el que estudiaron los genes *TGM1*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22* se identificaron mutaciones en el 75% de las familias, pero la distribución de las mismas fue diferente, el gen *TGM1* estaba mutado en el 68,7% de los casos y el gen *ALOXE3* en un solo paciente; no se detectaron mutaciones en los otros tres genes analizados [13].

TRATAMIENTO

En la actualidad el tratamiento de las ictiosis es, sobre todo, sintomático, aunque cabe esperar que los avances en el conocimiento de su etiopatogenia permitan solucionar el defecto genético o sustituir las proteínas deficitarias [77].

Como medidas generales, los pacientes con ictiosis, sobre todo los neonatos con formas graves, se benefician de un ambiente húmedo, siendo esencial controlar el balance hidroelectrolítico y las infecciones con puerta de entrada cutánea. Para ello, la higiene es esencial para evitar la sobreinfección y favorecer la eliminación de las escamas. Un gel de pH ácido es el producto más recomendado para este fin.

Como tratamientos tópicos, las sustancias más empleadas son emolientes y queratolíticos, tal es el caso de la urea, los alfa-hidroxiácidos, en especial el ácido láctico, y el propilenglicol (agente hidratante). Los aceites vegetales y minerales, la vaselina y la parafina tienen una acción predominante como emolientes y actúan evitando la pérdida de agua. El ácido salicílico es un excelente queratolítico, pero su uso en las ictiosis infantiles es poco aconsejable por el riesgo de absorción y toxicidad [78]. Los retinoides tópicos (ácido retinoico, retinal, isotretinoína, adapaleno, tazaroteno, etc.) tienen acción queratolítica y queratoplástica [79, 80]. En algunos estudios se ha demostrado la eficacia de los derivados de la vitamina D, como el calcipotriol y el tacalcitol.

Como tratamientos sistémicos, los retinoides orales son las únicas medicaciones utilizables en la mayoría de las ictiosis graves, en las que no resulta posible el control con tratamientos tópicos.

1.3 ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS

La piel en su conjunto se ha considerado como uno de los órganos más extensos del organismo humano, constituyendo del 12 al 15% del peso corporal. Clásicamente se ha dividido en tres capas bien definidas desde el exterior al interior: epidermis, dermis e hipodermis.

La epidermis es la capa más superficial de la piel, siendo su función principal la de proteger al organismo del medio ambiente. Debido a su capacidad de renovación constante, es capaz de reparar la pérdida de la masa celular causada por el rozamiento y como consecuencia de la duplicación celular que se origina en su capa más profunda, mantener un grosor uniforme.

La epidermis tiene cuatro tipos de células características, los queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las células dendríticas cutáneas, entre las que se encuentran las células de Langerhans. Las primeras, estructurales y más abundantes; las segundas con actividad en la protección frente a las radiaciones solares y responsables del color cutáneo; las células de Merkel con funciones sensitivas, y las células de Langerhans de carácter inmunológico.

Las células de la epidermis se dividen en cinco capas o estratos, dependiendo del grado de diferenciación de los queratinocitos (figura 6):

ESTRATO BASAL

También se denomina estrato germinativo. Es una monocapa de células cilíndricas, siendo estas células las únicas que experimentan mitosis [81, 82].

A medida que se forman nuevas células, las primeras migran o se desplazan hacia las capas superiores de la epidermis hasta que se desprenden en la superficie cutánea. Los queratinocitos mitóticos son cuboides o columnares y se encuentran firmemente anclados a la membrana basal que se separa de la dermis subyacente por hemidesmosomas, uniéndose a las células adyacentes por desmosomas verdaderos.

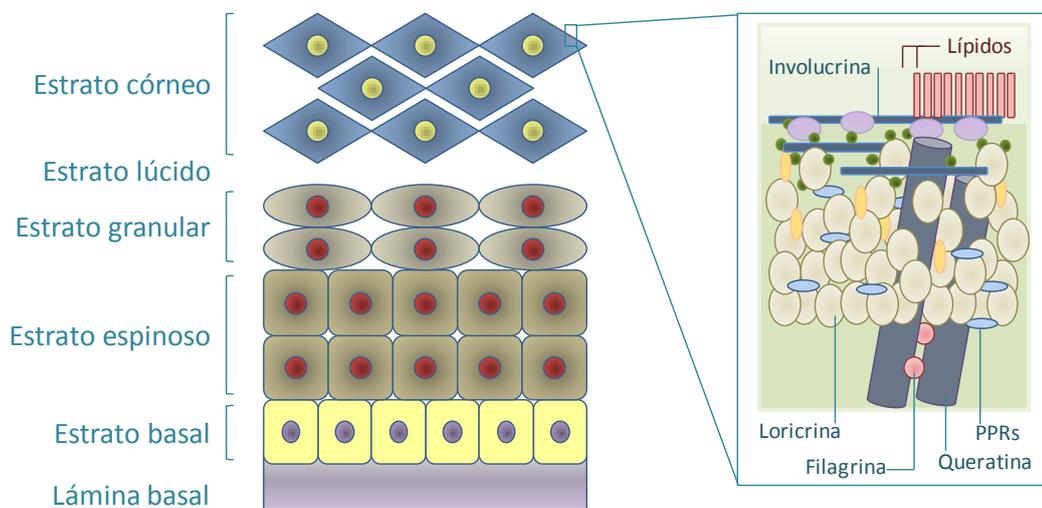


Figura 6. Estratos de la epidermis (izquierda) y detalle de la estructura de la capa cornificada (derecha) [83]. PPRs: pequeñas proteínas ricas en prolina.

ESTRATO DE CÉLVLAS ESPiNOSAS

El estrato de células espinosas consta de 8 a 10 capas de células de forma irregular con puentes intercelulares muy destacados. Las células de esta capa son ricas en ADN, necesario para la síntesis proteica que resultará en la producción de queratina. Una vez alcanzado este estrato, las células se encuentran en estado post-mitótico e inician un programa de diferenciación, siendo empujadas hacia la superficie de la piel por células nuevas, producidas en la capa basal [82, 84].

ESTRATO GRANULOSO

Las células de esta capa contienen gránulos que encierran en su interior proteínas y lípidos, denominados cuerpos lamelares de Odland [85-89]. Muchos de estos gránulos contienen precursores de la capa córnea que serán depositados finalmente sobre la superficie interna de la misma. Además, en esta etapa se inicia el proceso de queratinización, algunos de estos gránulos están rellenos de queratohialina, necesaria para la producción de queratina [90].

Las células se distribuyen de dos a cuatro capas y, como han empezado a degenerar, se observa en el citoplasma altas concentraciones de enzimas lisosomales, faltando ocasionalmente el núcleo.

ESTRATO LÚCIDO O DE TRANSICIÓN

Es una región caracterizada por un intenso remodelamiento. En esta zona, los orgánulos intracelulares son destruidos por proteasas y nucleasas. Paralelamente a esta destrucción tiene lugar la formación del estrato córneo y la estabilización de los filamentos intermedios de queratina. El resultado de este proceso es la construcción de la capa epidérmica más superficial, la cual abarca la diferenciación terminal de los queratinocitos, llamados finalmente corneocitos.

Los queratinocitos del estrato lúcido son diáfanos y se encuentran agrupados; carecen de núcleo y el citoplasma está lleno de una sustancia gelatinosa, la eleidina, que se transformará en queratina. La eleidina es muy rica en lipoproteínas y cumple la función de impedir la entrada o salida de agua.

ESTRATO CÓRNEO

Es el más superficial de la epidermis, está formado por células escamosas muertas, planas y delgadas, que se desprenden continuamente, siendo reemplazadas por otras.

El citoplasma ha sido sustituido por queratina, una proteína hidrófoba. Las uniones entre células (desmosomas) aparecen reforzadas de manera que esta capa presenta una elevada resistencia a la erosión.

Los corneocitos constan de dos estructuras principales: una red de filamentos de queratina estabilizados por uniones bisulfito, embebidos en una matriz proteica, formada principalmente por filagrina; y una envoltura de proteínas covalentemente unida, asociada a lípidos, que les rodea (envoltura cornificada) [91, 92]. Para cubrir toda la superficie del cuerpo se necesitan millones de corneocitos.

Así, el proceso por el cual las células más profundas de la epidermis se llenan de queratina y se desprenden hacia la superficie de la piel, se denomina queratinización. Esta diferenciación incluye la formación de filamentos de queratina, la agregación de esos filamentos en tonofibrillas, la síntesis de cuerpos lamelares (proteínas y lípidos) y su liberación en la superficie de la piel.

El resultado final es la formación de un entramado de filamentos de queratina y sustancia interfibrilar que constituye la capa cornificada. En algunas enfermedades, como es el caso de las ictiosis, este proceso aumenta anormalmente produciendo una hiperqueratosis, caracterizada por una piel gruesa, poco elástica y que se agrieta con facilidad.

1.4 CAPA CÓRNEA. COMPONENTES ESTRUCTURALES

La envoltura cornificada es una estructura covalentemente reticulada que se forma debajo de la membrana plasmática de los queratinocitos en diferenciación [93-96]. La capa córnea es una estructura de 15nm densamente insoluble que tiene dos partes funcionales: una de 10nm, formada por proteínas covalentemente unidas, y una de 5nm formada por lípidos asociados, que cubre la parte en contacto con el exterior [91, 96-102]. Existen numerosas proteínas que funcionan como sustratos y son incorporadas dentro de esta estructura (tabla 3). Éstas incluyen tanto proteínas solubles (por ejemplo, involucrina y pequeñas proteínas ricas en prolina), como proteínas insolubles (por ejemplo, loricrina, periplaquina y envoplaquina).

Tabla 3. Proteínas precursoras del estrato córneo [103].

Proteína	Tamaño (kDa)	Localización cromosómica	Estrato córneo (%)
Involucrina ^a	65	1q21	5
Loricrina ^a	26	1q21	80
PPRs ^a	5-26	1q21 [104]	3-5
Cistatina A	12	3q21	2-5
Proelafina	10	20q12-q13	<1
Profilagrina ^a	>400	1q21	<1
Queratina tipo II	56-60	12q13	<1
Desmoplaquina	330/250	6p21	<1
Envoplaquina	210	17q25	<1
Periplaquina	195	16p13.3	<1
S100A10 y S100A11 ^a	12	1q21	<1
Anexina I	36	9q12-q21.2	<1

^a Localizadas en el complejo de diferenciación epidérmico [105, 106]. PPRs: pequeñas proteínas ricas en prolina.

Inicialmente se depositan las proteínas solubles formando un “andamio” que servirá de soporte para el resto de componentes estructurales [107, 108]. Las proteínas insolubles (loricrina, principalmente) serán depositadas más tarde en la superficie interna de este “andamiaje” [109, 110].

Las uniones entre las proteínas de la capa córnea se forman gracias a la acción de enzimas transglutaminasas (tgm). En la superficie de la epidermis se han identificado tres de estas enzimas: tgm1, tgm3 y tgm5 [111-121].

Los lípidos que forman parte de la capa córnea son principalmente ceramidas (45-50%), colesterol (25%) y ácidos grasos libres (10-15%). Estos lípidos se disponen formando láminas entre los espacios intercelulares de los corneocitos (figura 7) [122].

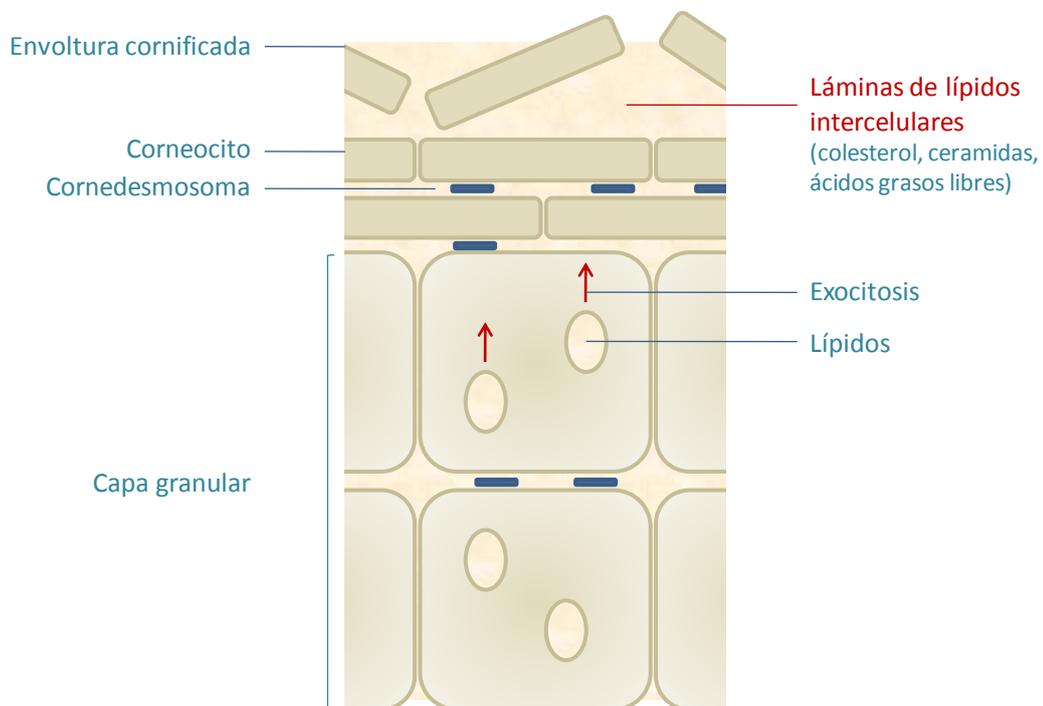


Figura 7. Disposición de los lípidos en la capa córnea [123].

1.5 TRANSGLUTAMINASAS

Las transglutaminasas son un grupo de enzimas dependientes de calcio, extensamente distribuidas, que catalizan reacciones de acil-transferencia de un grupo γ -carboxilo desde un residuo de glutamina a un receptor ϵ -amina de un residuo de lisina o por la incorporación de aminos primarias a residuos de glutamina de péptidos seleccionados, dando lugar a la formación de un enlace N^ϵ -(γ -glutamil)lisina (figura 8) [124]. Los mecanismos por los cuales sólo se seleccionan algunas proteínas para la formación de estos enlaces no están claros todavía [125]. Presentan una estricta especificidad en la selección de las proteínas ricas en glutamina que usan como sustrato y menor especificidad para seleccionar el grupo ϵ -amina aceptor.

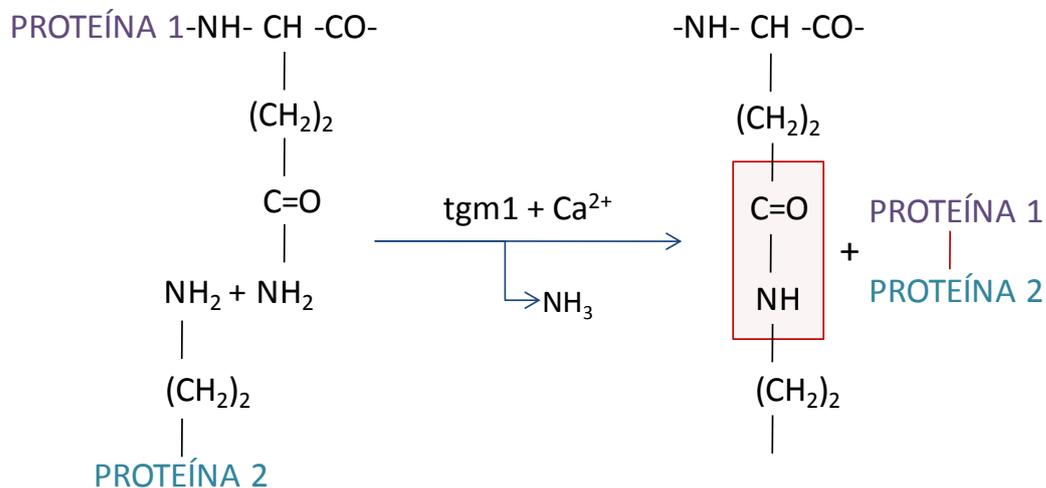


Figura 8. Formación del enlace N^ϵ -(γ -glutamil)lisina [83].

Los productos de esta unión presentan una alta masa molecular y son altamente resistentes a los daños mecánicos y a la degradación proteolítica. Se encuentran en un gran número de tejidos e intervienen en numerosos procesos.

Por otro lado, la desregularización de la actividad de estas enzimas está asociada generalmente a pérdidas de mecanismos homeostáticos de la célula, por lo que están involucradas en un gran número de enfermedades, incluyendo neurodegeneración crónica, enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades relacionadas con fibrosis tisular y enfermedades de la piel, entre otras [126].

No sólo en mamíferos existen proteínas que muestran actividad transglutaminasa, también se han localizado en microorganismos [127], plantas [128], invertebrados [129], anfibios [130], peces [131] y aves [132].

En mamíferos, se han identificado nueve genes que codifican transglutaminasas [117, 133-135] y de éstos, hasta el momento, sólo seis han sido aislados y caracterizados a nivel de proteína (tabla 4).

Tabla 4. Familia de las transglutaminasas [103].

Proteína	Localización cromosómica	Gen	Función	Tamaño aa (kDa)
Factor XIII	6p24-25	<i>F13A1</i>	Coagulación sanguínea, cicatrización	732 (83)
Band4.2	15q15.2	<i>EPB42</i>	Estructural en eritrocitos	690 (72)
tgm1/K	14q11.2	<i>TGM1</i>	Formación capa córnea	817 (90)
tgm2	20q11-12	<i>TGM2</i>	Muerte celular, diferenciación	686 (80)
tgm3	20q11-12	<i>TGM3</i>	Formación capa córnea	692 (77)
tgm4	3q21-22	<i>TGM4</i>	Coagulación seminal	683 (77)
tgm5/X	15q15.2	<i>TGM5</i>	Diferenciación epidermis	719 (81)
tgm6/Y	20q11	<i>TGM6</i>	Desconocida	¿?
tgm7/Z	15q15.2	<i>TGM7</i>	Desconocida	710 (80)

Transglutaminasas expresadas en la epidermis en negrita.

En la familia de las transglutaminasas se incluye al factor XIIIa, que está involucrado en la estabilización de los monómeros de fibrina durante el proceso de coagulación sanguínea y en la cicatrización de las heridas [136, 137]; a la proteína tgm4, implicada en la coagulación del líquido seminal [138]; a la proteína Band4.2, que es inactiva y tiene una función estructural en eritroblastos y eritrocitos [139]; a la proteína tgm2, expresada ubicuamente en la célula y con múltiples funciones [140]; y a las transglutaminasas específicas de la epidermis: tgm1 [133, 141], tgm3 [142] y tgm5 [135, 143-145]. Cuatro miembros de esta familia se expresan en los queratinocitos o en tejido epidérmico (tabla 5) [103].

Tabla 5. Transglutaminasas específicas de la capa superficial de la epidermis.

Proteína	Expresión en la epidermis	Modificaciones postraduccionales	Localización subcelular	Reguladores de actividad
tgm1	Expresada en las capas espinosa y granular	Fosforilación, misristoilación, palmitoilación, proteólisis	Membrana plasmática, citosol	Calcio
tgm2	Ausente o en bajos niveles, expresada bajo condiciones especiales		Citosol	Calcio, GTP
tgm3	Expresada en las capas espinosa y granular	Proteólisis [146]	Citosol	Calcio, GTP
tgm5	Expresada en las capas espinosa y granular y en bajos niveles en el estrato basal		Matriz nuclear y citoesqueleto	Calcio, GTP

La transglutaminasa 1 está principalmente unida a la membrana plasmática, aunque también aparece de forma soluble, en bajos niveles, en el citoplasma; es activada de diversas formas por proteólisis y está involucrada en el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos.

La comparación de las secuencias de todos los genes que codifican transglutaminasas hace suponer que la familia surgió por duplicaciones y posterior evolución divergente de un antecesor común y que fueron dispersados posteriormente a lo largo del genoma [147]. La secuencia de aminoácidos de la enzima *tgml* muestra de un 49 a un 53% de homología con otras transglutaminasas conocidas. Aunque la estructura primaria de estas enzimas parece ser diferente, todas ellas muestran una secuencia común de aminoácidos en el sitio activo [117] y un requerimiento de calcio para llevar a cabo su actividad. Las diferencias en la estructura primaria son, probablemente, responsables de sus diversas funciones biológicas [148].

TRANSGLUTAMINASA 1

GEN *TGMI*

El gen *TGMI* está localizado en el cromosoma 14, en la posición 14q11.2 [141]. Se extiende 14.3Kb que contienen 15 exones separados por 14 intrones [149] (figura 9). Las posiciones de estos 14 intrones han sido conservadas en comparación con otros genes que codifican transglutaminasas, aunque el gen *TGMI* tiene intrones relativamente cortos. Por otro lado, la enzima *tmg1*, de 90kDa, es la más larga de las nueve transglutaminasas conocidas.

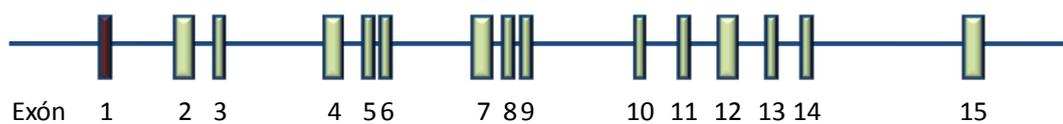


Figura 9. Organización del gen *TGMI*. En azul, regiones intrónicas; en granate, exón 1 (no codificante); en verde, exones del 2 al 15.

El gen *TGMI* se transcribe en un ARN mensajero (ARNm) de 2731pb, estando localizado el comienzo de la transcripción en el segundo exón. El tamaño de los exones 3 al 14 está marcadamente conservado entre los genes de la *tgm1* y el factor XIII, otro miembro de la familia [150].

La expresión del gen *TGMI* se limita a los epitelios escamosos estratificados, comenzando a expresarse inmediatamente por encima de la capa basal [151] o en la zona media del estrato espinoso y persistiendo en el estrato granuloso y córneo [152, 153].

La región promotora del gen *TGMI* en queratinocitos en cultivo presenta dos sitios Sp1 y un sitio AP1 [154-161]. Se trata de una zona de 200pb que se sitúa de -1.6 a -1.4Kb aguas arriba del inicio de la transcripción, altamente conservada en mamíferos. Ensayos realizados con cultivos de queratinocitos transfectados demuestran que mutaciones en estas tres zonas de unión a factores de transcripción producen una pérdida de la actividad transcripcional [161].

Kim y colaboradores demostraron la existencia de dos transcritos variantes del gen: el más raro, que pierde dos nucleótidos cerca del final del extremo 5', usa un codón de inicio alternativo y difiere de la forma común, más larga, sólo en los primeros 15 aminoácidos, se le denomina *TGM1b*. Además, en la secuencia de nucleótidos del intrón 14 existen varios tramos de repeticiones de dinucleótidos que muestran un extenso número de polimorfismos en la población humana [147].

Las mutaciones en el gen *TGMI* están asociadas con ictiosis laminar autosómica recesiva y con eritrodermia ictiosiforme congénita no ampollosa, así como con las variantes menos frecuentes de ICAR.

Desde que en el año 1995 se identificó el gen *TGMI* como responsable de algunos casos de ICAR, se han descrito más de 140 mutaciones en pacientes de diversos orígenes. Todas estas alteraciones están disponibles en la base de datos <http://www.biobase-international.com/>.

La distribución de los tipos de mutación descritos hasta la fecha se representa en la siguiente figura (figura 10).

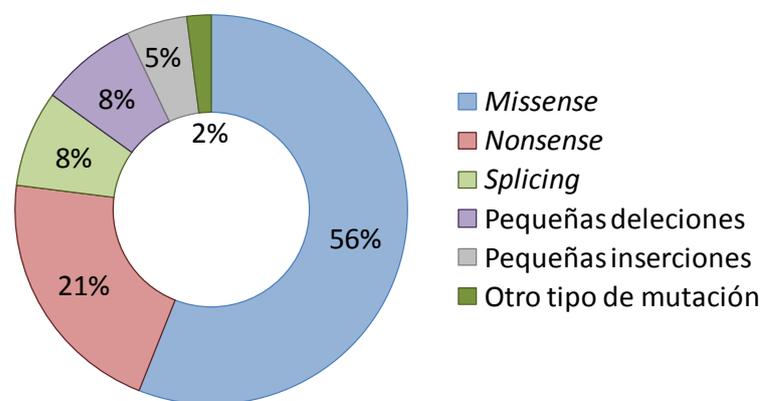


Figura 10. Distribución de los tipos de mutación descritos en el gen *TGMI*.

Las mutaciones más frecuentes en el gen *TGMI* son *missense*, consistentes en la sustitución de un aminoácido por otro, alcanzando el 56% del total de las mutaciones detectadas en el gen; seguidas de las mutaciones *nonsense* (21%), en cuyo caso el codón resultante en la sustitución es un codón de parada.

Un 8% de las mutaciones están situadas en sitios críticos de procesamiento intrónico (mutaciones de *splicing*). También se han descrito pequeñas deleciones e inserciones (13%), considerándose pequeñas a aquellas de hasta 20 nucleótidos, que provocan cambios en la fase de lectura y como consecuencia, en la mayoría de los casos dan lugar a la aparición de codones de parada prematuros y, por lo tanto, a proteínas truncadas.

El 2% de las mutaciones restantes lo constituyen aquellas que se localizan en la región promotora del gen y que afectan a los niveles de expresión del mismo; a mutaciones tipo *indel* consistentes en la pérdida de uno o varios nucleótidos y la inserción de otros en esa misma posición y a grandes reordenamientos (aquellos que abarcan varios exones o incluso a todo el gen). Estas mutaciones son poco frecuentes y hasta el momento, sólo se ha identificado una mutación de cada uno de estos tipos [38, 162, 163].

De los 817 aminoácidos que conforman la proteína *tgml*, 54 (6,6%) son argininas; 4 de los 6 codones que las codifican contienen dinucleótidos CpG. El 34% de todas las mutaciones *missense* descritas hasta el momento en el gen *TGMI* recaen en argininas, siendo los cambios nucleotídicos más frecuentes en sus codones las transiciones C>T o G>A. Esta alta incidencia de mutaciones de las argininas puede ser consecuencia de la metilación y desmetilación que sufren los dinucleótidos CpG asociadas con la inactivación transcripcional y la activación de genes [164, 165].

El 85% del total de todas las mutaciones descritas en *TGMI* se sitúan en los dos primeros tercios del gen aunque se han descrito mutaciones en todos los exones codificantes. El exón 3 es el más mutado, hasta un 14% de las mutaciones se localizan en él; seguido por el exón 8 con un 12% de mutaciones, el exón 7 con un 11% y los exones 4, 5 y 6, con un 10% cada uno.

La mutación descrita en la región más próxima al extremo 5' del gen es la c.109A>G p.R37G, localizada en el primer exón codificante, y la situada en la región más cercana al extremo 3' es la c.2320C>T p.Q774X en el exón 15.

PROTEÍNA TGM1

Tanto la secuencia de nucleótidos del gen *TGM1* como la secuencia de los aminoácidos de las regiones codificantes en humano y en ratón se determinaron en el año 1990. Ambas proteínas tienen un peso molecular aproximado de 90KDa y muestran un 92% de similitud [133]. El gen *TGM1* codifica una proteína de 817 aminoácidos que se expresa en las capas más altas de la epidermis, principalmente en los estratos espinoso y granular; además, esta expresión está directamente relacionada con el grado de diferenciación del queratinocito. La *tgm1* es la principal enzima responsable de la formación del estrato córneo [147].

La proteína *tgm1* es modificada co- y postraduccionalmente por la unión de ácidos grasos esterificados (miristato y palmitato) mediante un enlace tioéster en el extremo amino terminal [153]. Tratamientos con inhibidores de la síntesis proteica muestran que la miristoilación ocurre a nivel de la traducción y que la unión con el palmitato ocurre posteriormente. Así, se ancla a la membrana plasmática y puede ser solubilizada fácilmente mediante detergentes aniónicos [115]. Sin embargo, una pequeña porción de transglutaminasa (5-10%) carece de estos ácidos grasos y se encuentra soluble en el citoplasma.

El sitio crítico de unión al miristato y palmitato es un conjunto de cinco residuos de cisteína (Cys 47, 48, 50, 51 y 53) que se encuentra en la secuencia C₄₇CGCCSC₅₃ de la proteína dentro del extremo amino terminal [166]. La pérdida o mutación de este grupo de cisteínas reduce la asociación de la proteína con la membrana plasmática del queratinocito. Aunque sólo se necesita una cisteína para la adición del palmitato, son necesarias más de una para que la *tgm1* se ancle perfectamente.

Estudios *in vitro* confirman que es necesario que la apoproteína *tgm1* se active mediante proteólisis para que lleve a cabo su actividad [167]. Las posiciones exactas de este procesamiento han sido localizadas después de los residuos Gly93 y Gly573 dando lugar a fragmentos de 10, 33 y 67kDa [147].

La subunidad de 10kDa contiene el extremo amino terminal. El nivel de los productos de este procesamiento proteolítico incrementa con la diferenciación del queratinocito, sugiriendo que este proceso está regulado (figura 11).

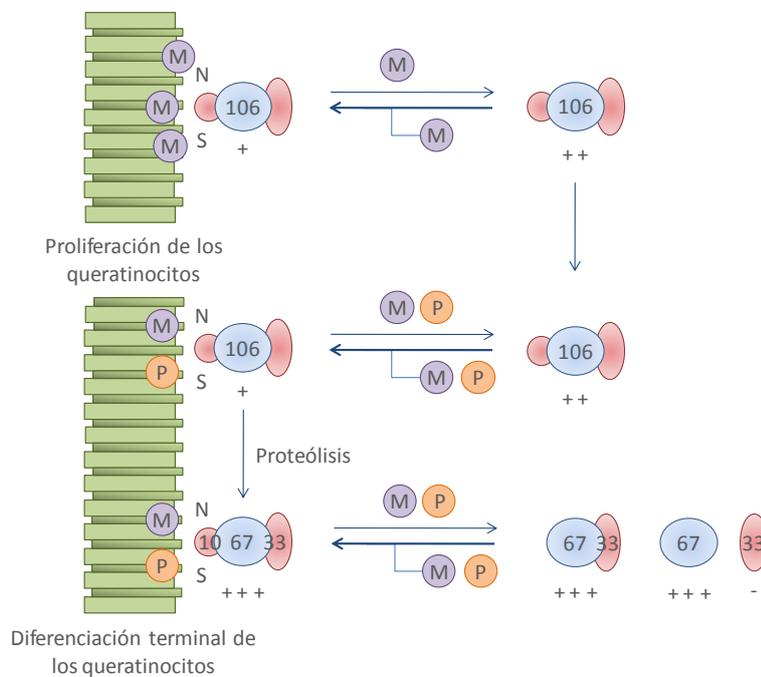


Figura 11. Unión de la enzima *tgm1* a la membrana plasmática y procesamiento proteolítico [83]. (M: miristato; N: extremo N-terminal; P: palmitato; S: serina; +: actividad; -: no actividad).

Además de la acilación lipídica y del procesamiento proteolítico, la proteína *tgm1* se fosforila en los residuos de serina, principalmente en la Ser82 de la región amino-terminal, en la proximidad de los sitios de anclaje a la membrana, lo que indica que podría influir en dicha unión [168, 169].

ESTRUCTURA

La estructura de la proteína *tgm1* se ha deducido a partir del modelo de la proteína *tgm3*. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la familia de las transglutaminasas muestra más de un 50% de homología entre ellas, lo que hace pensar que su estructura sea similar.

El modelo de la proteína *tgm1* consta de cinco dominios estructurales: un dominio N-terminal de 10kDa (Met1-Arg92) por el que está unida a la membrana plasmática, que es exclusivo de *tgm1* ya que es la única de la familia con esta localización celular; y cuatro dominios que poseen una elevada similitud con *tgm3* (dominios sandwich- β (Ser93-Phe246), catalítico (Asn247-Arg572) de 67kDa, barril β 1 (Gly573-Arg688) y barril β 2 (Thr689-Ala816) de 33kDa) (figura 12).

El dominio catalítico alberga los sitios activos, que corresponden a los residuos Cys376, His435 y Asp458. Estos residuos se encuentran protegidos en el interior de una hendidura formada por dos láminas β del dominio catalítico y el extremo carboxilo-terminal del dominio barril β 1.

Como otras transglutaminasas, *tgm1* es una enzima dependiente de calcio (Ca^{2+}), de hecho, su actividad se incrementa cuando las células son tratadas con este catión [112, 124, 170]. Basándose en la secuencia homóloga a *tgm3* se han situado los sitios de unión al calcio de *tgm1* en los residuos Trp341, Trp432 y Tyr620, pertenecientes a los dominios catalítico y barril β 1.

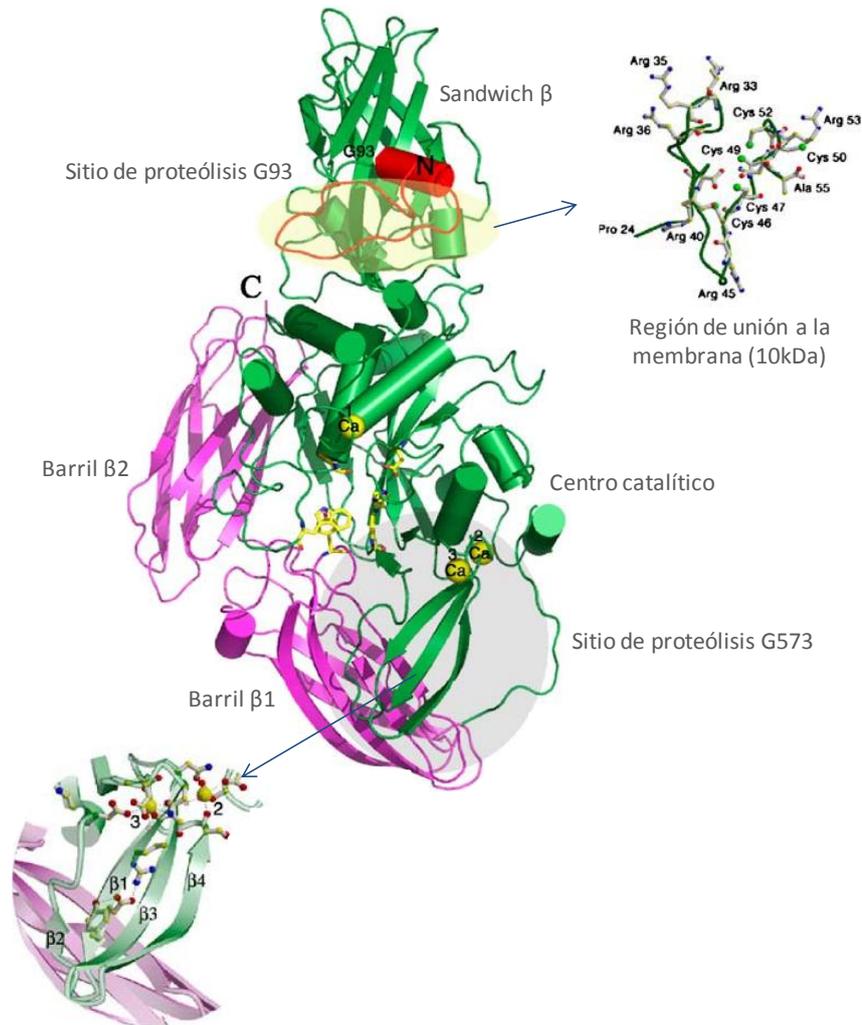


Figura 12. Estructura tridimensional de la enzima tgm1 [148]. Señalados los sitios proteolíticos Gly93 y Gly573. En verde, los dominios sandwich- β y catalítico. En magenta, los dominios barril $\beta 1$ y $\beta 2$. En amarillo, los iones de calcio en sus sitios de unión. En rojo, el fragmento N-terminal; representada parte de su estructura secundaria (Pro24-Ala55) en el extremo superior derecho. Sombreada en gris, la región que contiene los tres residuos catalíticos (Cys376, His435, Asp458), los iones de calcio y las láminas β que forman este motivo estructural. Por último, se detalla el mismo en el extremo inferior izquierdo de la figura.

FUNCIÓN

El Ca^{2+} es un importante regulador de la diferenciación epidérmica, tanto *in vivo* como *in vitro*, por su papel como cofactor de *tgm1*, habiéndose observado que el nivel de calcio se incrementa en las capas superiores de la epidermis [171]. Un método estándar para desencadenar un incremento en la actividad de *tgm1* en cultivos de queratinocitos, es cambiar a las células la concentración de calcio de baja a media. Este cambio hará que la célula cese la proliferación celular y comience su diferenciación al dar lugar a un aumento de la expresión de las proteínas precursoras de la capa córnea, elevando el nivel y la actividad de las mismas e incrementando la formación del estrato córneo [172, 173]. Otros agentes, como los ésteres de forbol y el ácido retinoico, también influyen en el nivel y la actividad de la proteína *tgm1* en células en cultivo [158, 174].

La proteína *tgm1* cataliza, durante la formación del estrato córneo, la unión de proteínas epidérmicas entre sí y la unión de poliaminas a proteínas, mediante el enlace N^{ϵ} -(γ -glutamil)lisina. Los sustratos que intervienen en esta unión son principalmente proteínas estructurales del estrato córneo, que son ricas en glutaminas y lisinas, como loricrina, involucrina, pequeñas proteínas ricas en prolina y filagrina, entre otras.

SUSTRATOS

Se ha sugerido que las proteínas precursoras del estrato córneo podrían tener un origen común, dado que sus regiones amino y carboxilo-terminales son semejantes. Además, los genes que las codifican tienen una estructura similar (un exón corto, un intrón y un exón largo donde se localiza la región codificante) y se encuentran en el cromosoma 1 [175].

Las distintas proteínas se diferencian entre sí en la región central, que sería la parte más evolucionada desde el punto de vista filogenético. A continuación, se describen algunos de los sustratos más importantes utilizados por la enzima tgm1:

Involucrina

La involucrina es una proteína epidérmica, localizada en la capa córnea y en el citoplasma de los queratinocitos. Fue la primera proteína precursora de la capa cornificada identificada y clonada [176]. Se calcula que supone de un 5 a un 10% de todas las proteínas solubles y alrededor de un 1% del total de proteínas de cultivos de queratinocitos humanos [107].

Esta proteína se sintetiza precozmente durante el proceso de diferenciación, manteniéndose soluble hasta que, por acción de la enzima transglutaminasa 1, pasa a formar parte de la envoltura cornificada. Sin embargo, una parte de la involucrina sintetizada no se une en dicha envoltura, sino que permanece soluble [177]. La involucrina es uno de los primeros precursores incluidos en la envoltura cornificada y sirve de “andamio” para el resto de componentes sobre el que se entrelazarán los filamentos de queratina [91].

La involucrina está compuesta por 585 aminoácidos. La molécula está estructurada por una serie de secuencias repetidas de 10 aminoácidos cada una, tres de los cuales son residuos de glutamina y dos de glutamato [178-180]. El alto porcentaje de estos residuos identifica a la involucrina como sustrato de la enzima transglutaminasa [107, 181]. A pesar del elevado número de residuos de glutamina que componen la involucrina, la enzima transglutaminasa tiene preferencia por la glutamina 496 [182].

Loricrina

Aunque inicialmente se consideró que la involucrina era el sustrato “preferido” de la transglutaminasa dado su alto contenido en residuos de glutamina, la loricrina es más importante cuantitativamente [109], representando el 5-10% del total de ARNm de la epidermis humana [110]. Está formada por 315 aminoácidos, de los cuales un 47% corresponden a residuos de glicina. En su molécula existe una secuencia que se repite, consistente en un aminoácido alifático o aromático (generalmente tirosina, fenilalanina o isoleucina), y varios residuos de glicina (G), serina (S) y/o cisteína (C).

Se ha propuesto un modelo para la estructura de esta proteína (figura 13), según el cual las secuencias de G-S-C se disponen formando bucles. Las secuencias de aminoácidos que unen estos bucles son ricas en glutamina (Q) y lisina (K), y actúan como receptores y donantes de grupos amina en la reacción catalizada por la enzima transglutaminasa epidérmica.

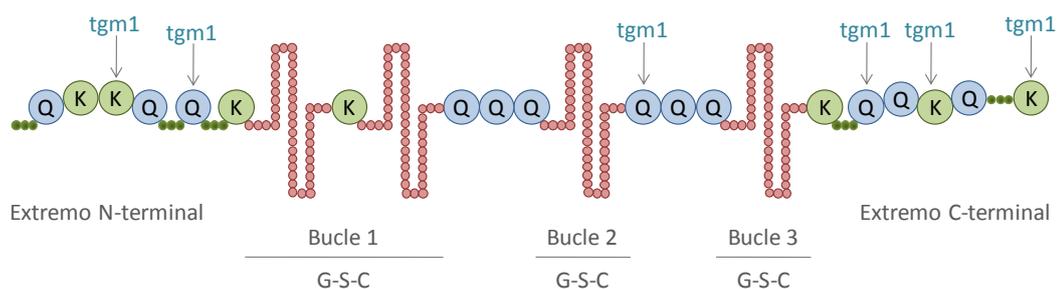


Figura 13. Estructura de la proteína loricrina [83].

Esta estructura dispuesta en bucles ricos en glicina a lo largo de la cadena de aminoácidos, probablemente, confiera un carácter flexible a la envoltura cornificada y, en general, a toda la epidermis.

La lorricrina es una proteína altamente insoluble, por esta razón, se encuentra en el interior de gránulos en la capa granular [89, 90]. Durante la diferenciación terminal es liberada de estos gránulos e incorporada al interior de la envoltura cornificada en formación [183].

Pequeñas proteínas ricas en prolina

Las pequeñas proteínas ricas en prolina son codificadas por una familia de multigenes compuesta por 14 miembros divididos en tres subgrupos [184]. La expresión de estos genes es inducida por calcio y factores de transcripción, como AP1 y Sp1 [185]. La estructura de estas proteínas incluye ocho o nueve repeticiones del aminoácido prolina flanqueadas por residuos de glutamina (Q) y lisina (K) (figura 14), que son los sustratos para la enzima transglutaminasa [104]. Se ha propuesto que la función de estas proteínas es actuar como puentes de unión entre otras proteínas precursoras de la capa cornificada.

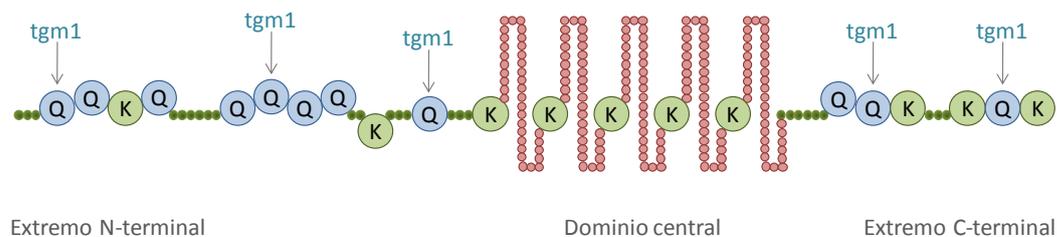


Figura 14. Estructura de las proteínas ricas en prolina [83].

Filagrina

La proteína filagrina se sintetiza como profilagrina y como consecuencia del procesamiento proteolítico se genera la proteína madura. Por su alto contenido en residuos de glutamina, actúa de sustrato para la enzima transglutaminasa.

El gen *FLG* que codifica la filagrina se encuentra en el cromosoma 1, posee tres exones y dos intrones. La región codificante está estructurada en forma de 10-12 unidades repetitivas de 972 pares de bases, cada una de las cuales codifica los 324 aminoácidos que constituyen la molécula de filagrina (figura 15) [186, 187].

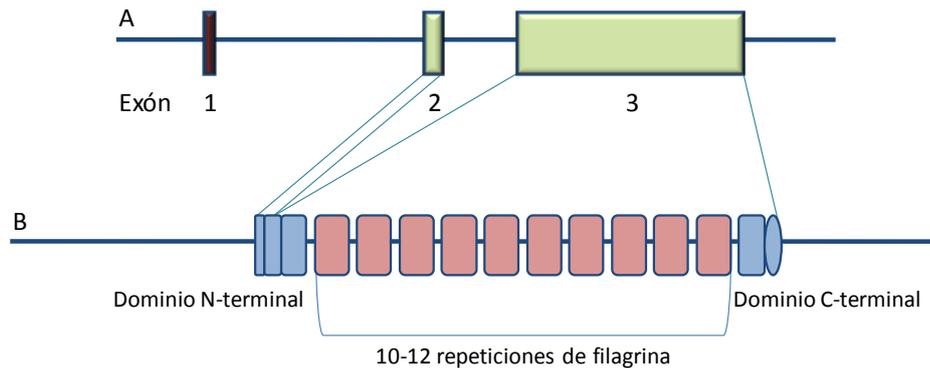


Figura 15. A) Estructura del gen *FLG*. B) Organización de la proteína profilagrina [188].

Tiene varias funciones importantes en la epidermis, una de ellas es la de intercalarse entre los filamentos de queratina que interactúan específicamente con ella y, por otro lado, podría tener un papel importante en la regulación de la apoptosis, debido a esta misma propiedad [189].

Lípidos

Se ha propuesto que los lípidos pueden ser sustrato de la enzima transglutaminasa 1 y que las ceramidas podrían estar unidas covalentemente a las proteínas que forman el “andamiaje” de la envoltura cornificada [100].

Recientemente, Steinert y colaboradores han demostrado que la proteína *tgml* promueve la formación de ésteres entre residuos de glutamina de la involucrina y diversas ceramidas [190]. Así, *tgml* podría, además de unir proteínas epidérmicas entre sí, unir lípidos de la superficie.

1.6 GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO O TRANSPORTE DE LÍPIDOS

La enzima *tgm1* es la encargada de la formación de la estructura física en la que se dispondrán el resto de componentes de la capa córnea, uno de los mayoritarios lo constituyen los lípidos. Mutaciones en genes que codifiquen enzimas directamente implicadas en su metabolismo, transporte o distribución dentro de la capa cornificada, alteran la adecuada descamación y como consecuencia provocan la aparición de un fenotipo típico de ictiosis [191]. Los genes implicados en el metabolismo de lípidos que se asocian con las ictiosis congénitas autosómicas recesivas se detallan a continuación:

ABCA12

El gen *ABCA12* se sitúa en el cromosoma 2, concretamente en la posición 2q33-35, se extiende en 206,89Kb que contienen 53 exones, todos ellos codificantes, dando como producto postraducciona una proteína de 2595 aminoácidos [192]. Mediante retro-transcripción inversa ha podido observarse su expresión principalmente en placenta, testículo, cerebro fetal y piel.

La proteína *ABCA12*, pertenece a la familia de proteínas ABC, cuya función es la de mediar el transporte de diferentes sustratos a través de las membranas celulares. Estas proteínas contienen dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP, que se someten a cambios conformacionales y facilitan la unión a las membranas y la disociación de los lípidos adjuntos [192, 193].

Hasta la fecha se han identificado 48 genes ABC que se han dividido en siete subfamilias, en base a la homología y organización de sus secuencias. Los miembros de la subfamilia ABCA participan en el transporte y secreción de lípidos [194].

La proteína ABCA12 funciona como transportadora de lípidos dependiente de ATP, cuya función es la de cargar los cuerpos lamelares de Odland de la capa granular, donde se localiza [195]; por lo tanto, está implicada en la distribución de los lípidos de la capa córnea y en el proceso de descamación (figura 16).

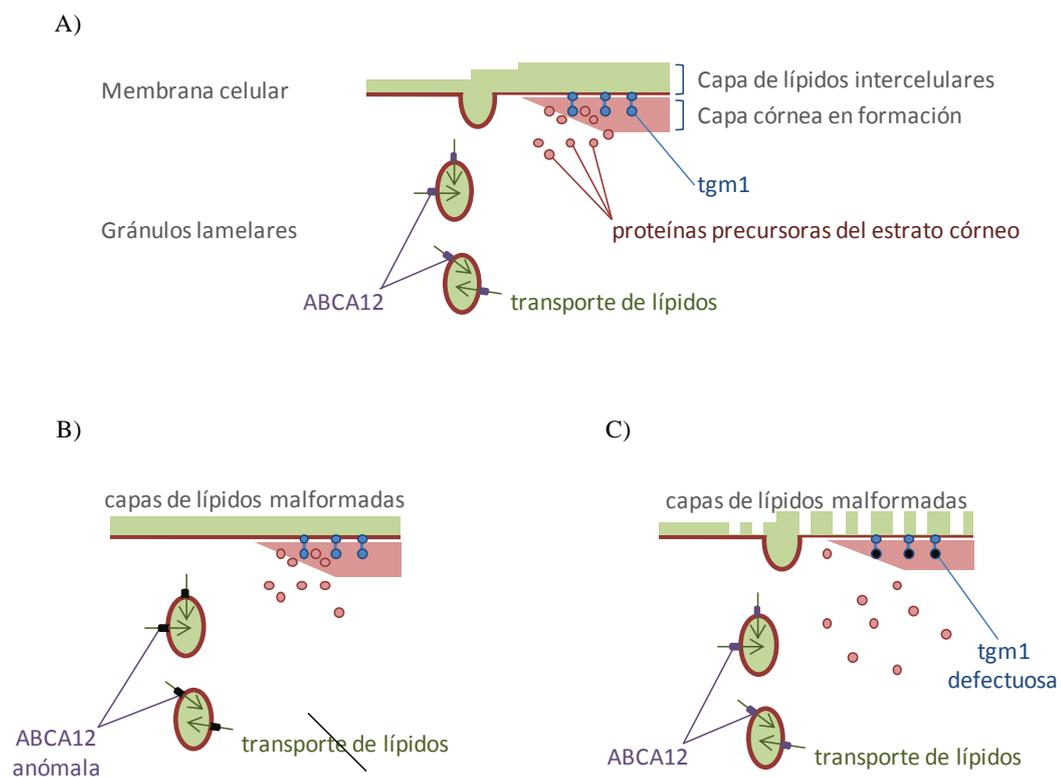


Figura 16. Efecto de mutaciones en los genes *TGM1* y *ABCA12* en la formación de la capa córnea. **A)** Esquema de un funcionamiento normal de las enzimas *tgm1* y *ABCA12*. **B)** Cuando el gen *ABCA12* está mutado la proteína no lleva a cabo su función y no se produce el transporte de lípidos. **C)** Si *TGM1* tiene alguna alteración la proteína no realiza la unión entre los precursores de la capa córnea, siendo ésta defectuosa y por lo tanto obtendremos una capa de lípidos malformada [19].

Además de actuar como transportadora de membrana su actividad es necesaria para la formación de ésteres de ceramidas de cadena larga, que son esenciales para el desarrollo de la estructura y el mantenimiento de la permeabilidad epidérmica [196].

La proteína ABCA12 sirve como transportadora de glucosilceramidas desde el aparato de Golgi hasta la superficie apical de la membrana cornificada de los queratinocitos, principalmente en las capas espinosa y granular (figura 17).

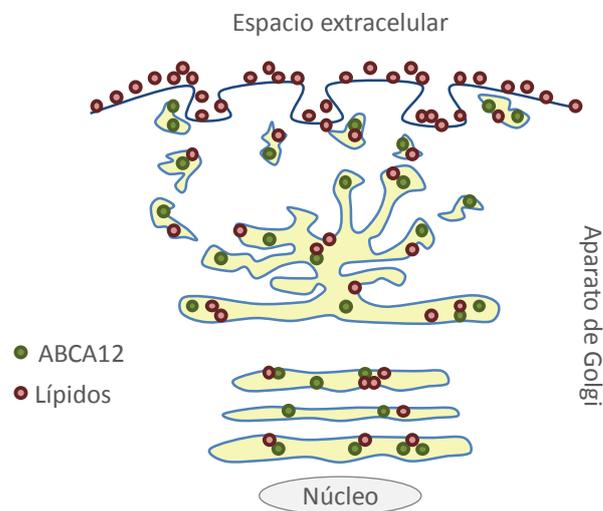


Figura 17. Transporte lipídico desde el aparato de Golgi hasta el espacio extracelular mediado por la proteína ABCA12 en los queratinocitos [197, 198].

Por otro lado, la proteína ABCA12 juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos; y participa en la cicatrización de las heridas [199].

Aproximadamente el 90% de los pacientes con ictiosis arlequín son portadores de mutaciones en el gen *ABCA12* y también un porcentaje muy bajo de pacientes diagnosticados de ictiosis laminar y de eritrodermia ictiosiforme congénita [19, 61, 63, 200, 201].

ALOX12B Y ALOXE3

Los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* se sitúan en el cromosoma 17, concretamente en la posición 17p13.1. Cada uno de estos genes contiene 15 exones, que codifican dos lipoxigenasas expresadas en la epidermis pertenecientes a la familia de proteínas LOX (12R-LOX de 701 aminoácidos y eLOX-3 de 711 aminoácidos), teniendo los dos genes un exón más que el resto de lipoxigenasas de la familia.

Los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* distan entre sí 8.5Kb; pertenecen a un grupo de genes que se extiende 100Kb y contiene también al gen *ALOX15B* y al pseudogen *ALOX15P* (figura 18) [68, 202, 203].

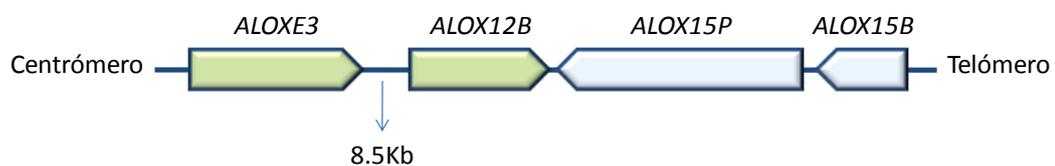


Figura 18. Mapa físico del grupo de genes LOX epidérmicos sobre el cromosoma 17 [68].

Su expresión predominante en las capas suprabasales de la epidermis apoya su papel en las fases avanzadas de la diferenciación epidérmica, participando en el procesamiento de los cuerpos lamelares [204, 205]. Ambas enzimas participan secuencialmente en la vía de las hepoxilinas (figura 19).

La lipoxigenasa 12R-LOX cataliza la conversión del ácido araquidónico en un ácido 12R-hidroxi-eicosatetraenoico y la eLOX-3 convierte este producto en un isómero epoxialcohol que pertenece a la familia de la hepoxilina A₃ [206, 207].

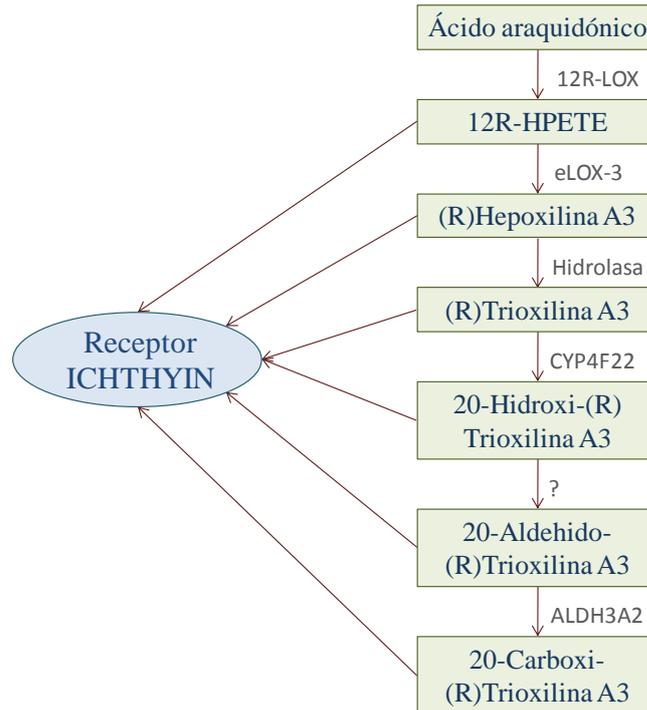


Figura 19. Representación esquemática de la vía de las hepoxilinas, en la que participan los genes *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22* responsables de algunos cuadros de ICAR [14].

Este producto hepoxilina es inestable y es hidrolizado en las células a un derivado trihidroxi específico (trioxilina). Aunque el papel exacto de los productos de la vía de las hepoxilinas no se conoce, se ha especulado que puedan participar en la formación de los lípidos intercelulares de la capa córnea o actuar como señales para promover la diferenciación de los queratinocitos.

Desde la publicación del año 2002 en la que se detectaron las primeras mutaciones en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* en pacientes con EIC originarios de países del área del Mediterráneo [208], se han identificado hasta la fecha un total de 37 mutaciones diferentes en el gen *ALOX12B* [36, 76, 204, 209-211] y 11 en *ALOXE3* [76, 208, 209] (figura 20). Todas estas variantes nucleotídicas están disponibles en la base de datos <http://www.biobase-international.com/>.

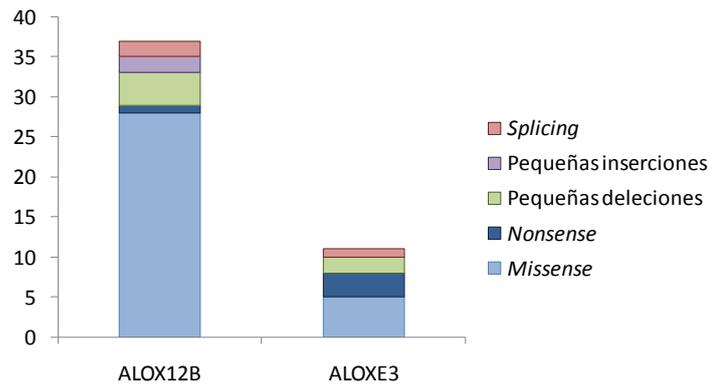


Figura 20. Distribución de los tipos de mutación descritos en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3*.

Las mutaciones más frecuentes identificadas en el gen *ALOX12B*, son *missense*, representando un 78%; seguidas de pequeñas deleciones con un 11%, pequeñas inserciones y mutaciones de *splicing*, con un 5% respectivamente.

En el gen *ALOXE3*, al igual que en *ALOX12B*, el tipo de mutación más frecuente es *missense* (72%), seguido de pequeñas deleciones (18%) y mutaciones de *splicing* (9%). No se ha detectado ningún otro tipo de mutación.

Mutaciones en estos genes son responsables del 14-17% de las ICAR [75, 76] y del 72,2% de la aparición del fenotipo de bebé colodión autorresolutivo [33, 36, 212]. Ambos genes son responsables de un porcentaje similar de casos de ICAR; sin embargo, se han identificado pocas mutaciones diferentes en el gen *ALOXE3*, debido a la alta frecuencia de dos mutaciones, la p.R234X y la p.P630L, que parecen representar sitios calientes de mutación.

La relación causal entre estas mutaciones y el fenotipo de los pacientes, se confirmó al demostrarse que la actividad catalítica de las LOX epidérmicas, estaba totalmente abolida en ellos [209, 213] y al reproducirse en modelos murinos un fenotipo ictiosiforme que copia al humano [214-217].

NIPAL4

El gen *NIPAL4*, también llamado *ICHTHYIN*, se localiza en el cromosoma 5 (posición 5q33.2-q34) (figura 21), contiene 6 exones que codifican una proteína de 404 aminoácidos y 44KDa con varios dominios transmembrana.

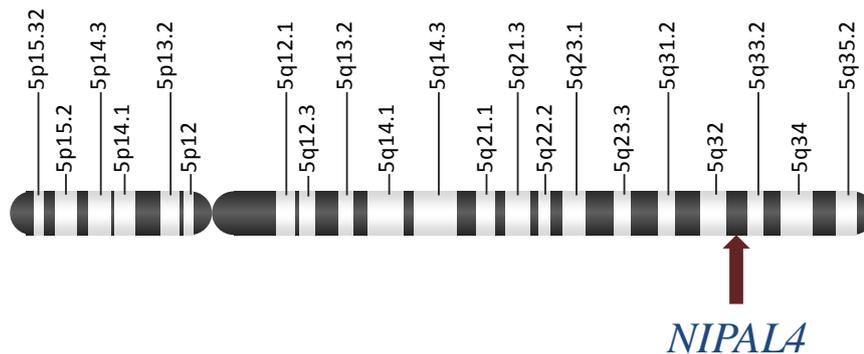


Figura 21. Posición del gen *NIPAL4* en el cromosoma 5.

La función de esta enzima es desconocida hasta el momento [218]. Se cree que podría tratarse de un receptor de membrana para algún ligando intermedio de la ruta en la que intervienen las lipoxigenasas 12R-LOX y eLOX-3 [206], estando por lo tanto, implicado en la formación de los cuerpos lamelares o en su transporte hacía el espacio extracelular [219]. A favor de este supuesto destacan dos hechos: en primer lugar, que las mutaciones en este gen se asocian en un 93% de los casos con un patrón ultraestructuralmente caracterizado por anomalías en los cuerpos lamelares y la presencia de membranas perinucleares elongadas al nivel de la capa granulosa; y en segundo lugar, que el gen *NIPAL4* se expresa fundamentalmente al nivel de la capa granulosa de la epidermis, que es la zona donde los cuerpos lamelares están presentes [220].

Desde que el gen *NIPAL4* se descubrió en el año 2004 [218], tan sólo 10 mutaciones distintas han sido descritas en pacientes procedentes de países mediterráneos como Argelia, Turquía, y Siria [218]; de países escandinavos [219], de Paquistán [220], Irán [221] y Sudamérica [218] (figura 22). Todas estas alteraciones están disponibles en la base de datos <http://www.biobase-international.com/>.

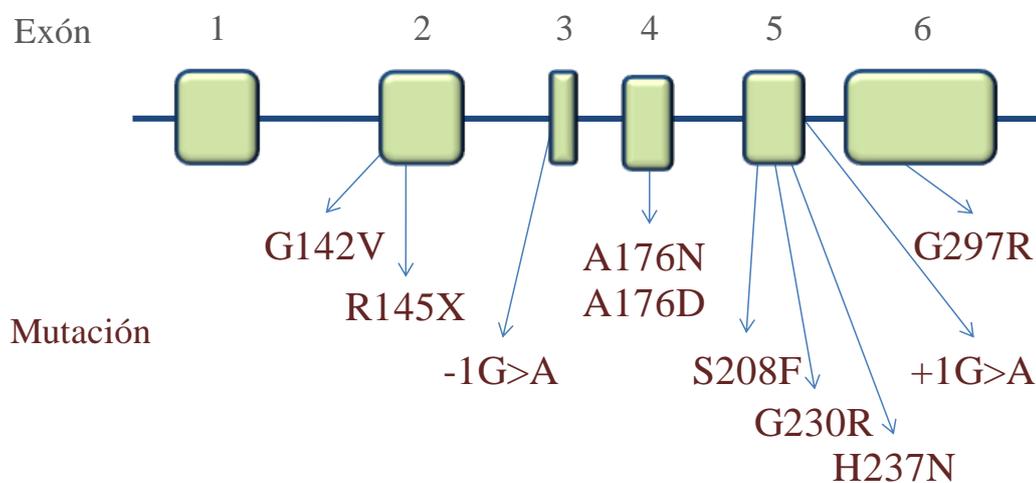


Figura 22. Mutaciones identificadas en el gen *NIPAL4* [221].

Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen. Excepto en el exón 1, en todos sus exones se detecta al menos una mutación; de todas ellas, 7 son *missense*, 1 *nonsense* y 2 de *splicing*. No se ha detectado hasta la fecha ningún otro tipo de mutación.

En el estudio genético de grandes cohortes de pacientes con ICAR, se han identificado mutaciones en el gen *NIPAL4* de entre el 8 al 18% de ellos [75, 76].

CYP4F22

En el año 2000 se asoció por primera vez a las ictiosis congénitas autosómicas recesivas con una región del cromosoma 19, pero no se determinó el gen candidato causante de la enfermedad [67].

En el año 2006 se clonó el gen *FLJ39501*, llamado también *CYP4F22*. Este gen se localiza en el cromosoma 19p13.12; contiene 12 exones que codifican un citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2, homólogo del leucotrieno B4- ω -hidroxilasa; de 531 aminoácidos con una masa molecular calculada de aproximadamente 62KDa [72].

La reacción catalizada por *CYP4F22* en la piel y sus sustratos pueden ser deducidos por analogía con lo que se sabe de sus homólogos *CYP4F2* y *CYP4F3* [222]. Se ha sugerido que participen en la vía de las hepoxilinas, catalizando el paso de trioxilina A3 a 20-hidroxi(R)-trioxina A3 (figura 19) y que el producto final de esta vía, la 20-carboxi-trioxilina A3, pueda tener un efecto biológico regulatorio clave en la piel [223].

Hasta la fecha únicamente se han descrito 8 mutaciones en este gen en 12 familias consanguíneas procedentes de países del Mediterráneo [72] y en una de origen israelí [224].

Las mutaciones detectadas incluyen: 5 *missense* (p.F59L, p.R243H, p.R372W, p.H435Y y p.H436D), 1 *nonsense* (p.W521X), 1 pequeña delección (c.981delC) y 1 gran reordenamiento (incluye la pérdida a nivel genómico desde el exón 3 al 12). Estas mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen.

HiPÓTESis Y OBJETiVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las ictiosis congénitas autosómicas recesivas son trastornos infrecuentes de la queratinización que se engloban en las formas no sindrómicas de ictiosis. Clásicamente se distinguían en este grupo la ictiosis laminar y la eritrodermia ictiosiforme congénita. Actualmente se incluyen también la ictiosis arlequín, el bebé colodión autorresolutivo, el bebé colodión autorresolutivo acral y la ictiosis en traje de baño.

Se ha estimado una prevalencia conjunta para ictiosis laminar y eritrodermia ictiosiforme de 1:138.000-1:300.000. En algunos países o regiones, como en Noruega y la costa Gallega, la prevalencia podría ser mayor debido a la existencia de efectos fundadores. Desde el punto de vista genético son muy heterogéneas. Seis genes han sido asociados a estas entidades: *TGM1*, *ABCA12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*.

El objetivo principal de nuestro estudio se centró en la búsqueda de mutaciones puntuales en los genes *TGM1*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*, en pacientes no relacionados entre sí, diagnosticados de ictiosis congénita autosómica recesiva, con el fin de encontrar el defecto genético que desencadena la enfermedad.

El segundo objetivo pretende ayudar a clarificar la clasificación de las ictiosis en base a la genética y aportar más datos para poder correlacionar los hallazgos genéticos con el fenotipo.

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

PACIENTES

En este estudio han participado 29 familias no relacionadas entre sí. Todas contaban con un individuo diagnosticado de ICAR, excepto cuatro de ellas en las que había dos probandos afectados.

Todos los pacientes fueron remitidos desde diversos hospitales al Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Cada uno de ellos fue debidamente informado de la naturaleza y objetivos del estudio, y se les solicitó su autorización para la extracción de una muestra de sangre para realizar el análisis genético.

Las muestras de sangre fueron obtenidas siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y fueron procesadas y analizadas en el Departamento de Medicina Molecular de la facultad de Medicina de la Universidad de esta misma ciudad.

En cada caso se solicitaron datos como el nombre, apellidos, sexo (M: mujer, V: varón), fecha de nacimiento, prematuridad, presencia o ausencia de membrana colodión (BC), eritema, ectropión y eclabión; alopecia, hiperqueratosis palmar y plantar; morfología y color de las escamas y el tipo de tratamiento (tablas 6 y 7).

Tabla 6. Resumen de los datos clínicos de los pacientes con ICAR recogidos en este trabajo I.

Familia	Código	Sexo	Diagnóstico	BC	Eritrodermia	Escamas grandes	Descamación fina	Color de las escamas	Ectropión/ectabiación	Alopecia	Hiperqueratosis palmoplantar	Trastornos de sudoración	Tratamiento
1	2359	V	IL			Sí	No	Marrón			Sí		Acitretino
	2375	M	IL	Sí	No	Sí	No	Marrón	No	Sí	Sí		Emolientes/ Etretinato/Acitretino
2	2371	M	IL		Sí (niñez)	Sí	No	Marrón	Ectropión	Sí			
3	2383	M	IL			Sí	No	Marrón		No	Sí		Emolientes/ Etretinato/Acitretino
4	2399	M	IL	Sí	No	Sí	No	Marrón	Ectropión	Sí	Sí		Etretinato
5	2527	V	IL	Sí	Sí (niñez)	Sí	No	Marrón	Ectropión	Sí	Sí		Etretinato
6	6413	V	IL	Sí	Sí (niñez)	No	Sí	Marrón	Ectropión (al nacimiento, corrección espontánea)	No	No		Acitretino/Emolientes
7	17034	M	IL	Sí	Sí	Sí	Sí	Marrón	No	No	Discreta	Hipohidrosis	No sistémicos
8	17199	V	IL										
9	17272	M	IL										
10	17596	V	EIC	Sí	Sí	No	Sí	Blanco	No	No	No		Emolientes
11	19836	M	EIC	Sí	Sí	Sí	Sí	Marrón	No	No	Discreta	Hipohidrosis/ Intolerancia al calor	Acitretino
12	19848	M	BCA	Sí	No	No	No		No	No	No		No
13	20284	M	EIC								Sí		
14	20503	V	IL			Sí							
15	21189	M	IL		No	Sí	No	Amarillo	No	Leve	No (afectación ictiósica)	No	Acitretino

Tabla 7. Resumen de los datos clínicos de los pacientes con ICAR recogidos en este trabajo II.

Familia	Código	Sexo	Diagnóstico	BC	Eritrodermia	Escamas grandes	Descamación fina	Color de las de las escamas	Ectropión/eclabión	Alopecia	Hiperqueratosis palmo/plantar	Trastornos de sudoración	Tratamiento
16	21275	V	EIC	Sí	Sí (leve)	No	Sí	Blanco	No	No	Sí	Hipohidrosis	Tópicos
	21276	M	EIC	Sí	Sí (leve)	No	Sí	Blanco	No	No	Sí	No	Tópicos
17	22033	M	ITB										
18	22219	M	EIC	No	Sí (leve)	No	Sí		No	No	Sí	Hiposudoración/alta fiebre	Tópicos
	22220	M	EIC	No	No	No	Sí		No	No	Sí	No	Tópicos
19	22223	V	BCA	Sí	No	No	No		No	No	Sí	No	Tópicos
20	22683	V	EIC	No	Sí	Sí (manos y pies)	Sí (resto del cuerpo)	Blanco	Ligero ectropión	No	Sí	Sí (intolerancia al calor)	Neotigason
21	22693	V	IL										
22	23100	V	IL	Sí	Sí (leve)	No	Sí	Blanco	No	No	Sí	Sí (leve)	Tópicos
23	23698	M	-	Sí	Sí	No	Sí		No	No	No		Acitretino
	23699	V	-	Sí	No	No	Sí		No	No	No		Emolientes
24	24027	V	IL										
25	24040	V	IL	Sí	No	Sí	No	Marrón	Sí	Sí	No	No	Efretinate
27	25459	M	EIC	Sí	Sí	No	Sí	Blanco	No	No	No	No	Emolientes
28	26040	M	ITB	Sí					Sí				Emolientes/acitretino
29	26179	M	BCA										

De los 29 probandos incluidos en el estudio, 15 fueron diagnosticados de ictiosis laminar, 7 de eritrodermia ictiosiforme congénita, 4 como bebé colodión (con curso autorresolutivo), 2 de ictiosis en traje de baño y 1 considerado sin clasificar, ya que fue remitido al laboratorio para el estudio genético de ictiosis congénita sin especificar su diagnóstico presuntivo (figura 23).

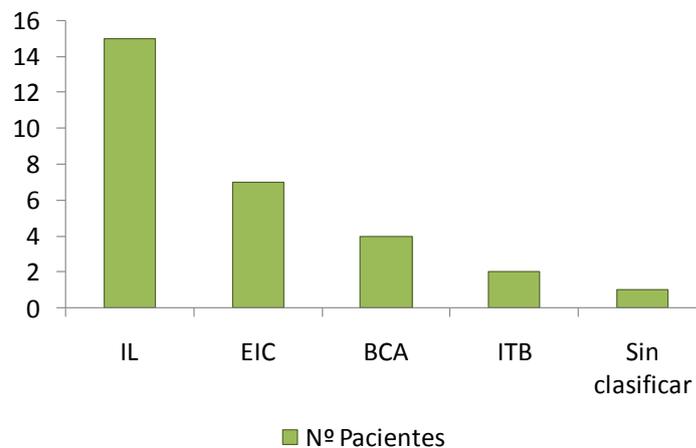


Figura 23. Distribución de los pacientes estudiados en base a su diagnóstico presuntivo. IL: ictiosis laminar; EIC: eritrodermia ictiosiforme congénita; BCA: bebé colodión autorresolutivo; ITB: ictiosis en traje de baño.

Esta serie de pacientes, comprende tanto mujeres como varones, el rango de edad de los mismos abarca desde etapas tempranas hasta la edad adulta. Todos ellos son de nacionalidad española, excepto una de las familias de origen ucraniano.

CONTROLES

Se analizaron 100 muestras de ADN obtenido a partir de sangre periférica de individuos que no presentaban ningún tipo de ictiosis ni otro tipo de enfermedad epidérmica.

Las muestras de sangre de estos controles fueron obtenidas previo consentimiento, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

3.2 ANÁLISIS MOLECULAR

EXTRACCIÓN DE ADN

A todos los individuos se les realizó una extracción de una muestra de sangre periférica, recogida en un tubo de vacío con EDTA como anticoagulante y almacenada a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN. El proceso seguido se detalla a continuación:

Tras resuspender y centrifugar la muestra de sangre periférica se aisló la interfase de células leucocitarias, las cuales se resuspendieron en tampón Fornace (0.25M sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl₂), EDTA 0.5M pH 8, que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20mg/L, que degrada las proteínas y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, que rompe las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55°C durante unas 16 horas; tras esta incubación se purificó el ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1).

Con este proceso el ADN queda en la fase acuosa, la cual se limpió de otros residuos mezclándola con CIAA y centrifugando para separar las dos fases, una que contiene el ADN y otra que contiene los detritos celulares.

Tras este paso se añadió etanol absoluto (EtOH) a la fase acuosa, precipitando el ADN, que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en agua bidestilada (ddH₂O).

La concentración y el grado de contenido proteico del ADN se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280nm respectivamente, en el espectrofotómetro automático de ADN/ARN (*GeneQuant, Pharmacia*), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/mL} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260nm es un valor de absorbancia que tienen 50µg de ADN/mL).

El cociente DO₂₆₀/DO₂₈₀ se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del ADN. Valores superiores indican un exceso de ARN, que se elimina tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente [225].

La muestra de ADN se almacenó en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN, como la posible contaminación.

AMPLIFICACIÓN DE ADN

Las muestras de ADN obtenidas a partir de la sangre periférica de cada paciente fueron amplificadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L: 12.5 μ L de *Master Mix (Promega)* (ADN Taq polimerasa, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, MgCl₂), 9.5 μ L de agua libre de nucleasas, 0.5 μ L de cada oligonucleótido o cebador (sentido, complementario de la hebra 3'→5' de ADN y anti-sentido, complementario de la hebra 5'→3') y 2 μ L de ADN (0,1-0,2 μ g/mL).

Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el ADN molde.

Se amplificaron mediante PCR los genes *TGMI*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPALA* y *CYP4F22*. Los oligonucleótidos seleccionados incluían todos los exones y sus regiones intrónicas adyacentes. Partimos de un programa estándar de PCR, adaptado en cada caso al fragmento que se amplifica. El programa de PCR estándar se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Programa estándar de PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5min	1
Desnaturalización	95°C	1min	
Anillamiento	Ta	30s	35
Extensión	72°C	1min	
Extensión final	72°C	10min	1

Ta: temperatura de anillamiento.

La temperatura de anillamiento depende directamente de la longitud del oligonucleótido y de su composición en G-C y A-T. Para su diseño deben tenerse en cuenta varias recomendaciones: que los cebadores tengan una T_a similar y un contenido equilibrado en pares G-C y A-T; evitar que un mismo cebador pueda doblarse e hibridarse consigo mismo; y evitar complementariedad entre los dos cebadores utilizados en la reacción.

Los oligonucleótidos se suministraron como un liofilizado, posteriormente fueron reconstituidos con agua destilada libre de nucleasas y almacenados en alícuotas a -20°C .

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se realizó en un laboratorio distinto de donde se extrajo el ADN.

Los programas de amplificación utilizados en nuestro trabajo para las diferentes combinaciones de oligonucleótidos, únicamente variaron en la temperatura de anillamiento, que se detalla para cada pareja de oligonucleótidos en las siguientes tablas (tablas 9, 10, 11, 12 y 13):

Tabla 9. Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los 15 exones del gen *TGM1* [49].

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Ta
<i>TGM1</i> EX1F	ATCTGGGCTGCAACAGAACTCGG	64°C
<i>TGM1</i> EX1R	GCACGGCCTCTGATAGTGTGG	
<i>TGM1</i> EX2F	ACTGGCTGGACTACCTGGTTA	56°C
<i>TGM1</i> EX2R	AGTCTCTGGTCCCATTAAAGC	
<i>TGM1</i> EX3F	AATGATAAGGGCCTGGGCACC	56°C
<i>TGM1</i> EX3R	GCCTCTCCCCACCAAACATAG	
<i>TGM1</i> EX4F	GTCCCAGGCTCCATCCCCTCTCCT	56°C
<i>TGM1</i> EX4R	TCCCTGTCTTTCCCTCCCATCTAC	
<i>TGM1</i> EX5/6F	GGTGAGGCCCCAGGGAGAGAAC	64°C
<i>TGM1</i> EX5/6R	CAGGAGGAGGGTGGGGGTGTG	
<i>TGM1</i> EX7F	TTTAGGGGTAAGGGGTGGTTG	64°C
<i>TGM1</i> EX7R	CTGTAGGGCCCCGGGCCACTCCT	
<i>TGM1</i> EX8/9F	ACTTGCCCCAACCCATGCCTTG	64°C
<i>TGM1</i> EX8/9R	TGTTAATCAGGTGGGGGAGATAAG	
<i>TGM1</i> EX10F	TGCCATCCCTCTCCTTCTCAG	56°C
<i>TGM1</i> EX10R	CCATGACTGAAGCCCAAGAAGGC	
<i>TGM1</i> EX11F	CCTCAGACCCTCTGGCTCAC	56°C
<i>TGM1</i> EX11R	CACTTGGCAGGAACACTTGTTGTG	
<i>TGM1</i> EX12F	GGGAAGCCTCATGTAGGGAAG	56°C
<i>TGM1</i> EX12R	GTCCTTATCCGGCCTTCACTC	
<i>TGM1</i> EX13F	TACGGTCCCCGTGTGTTTGG	56°C
<i>TGM1</i> EX13R	TGGGAAGGCCAGAGTGGAAG	
<i>TGM1</i> EX14F	AGCTCTTACTCCCCACTCCAC	56°C
<i>TGM1</i> EX14R	ACTGACTCCCTCTCCGGGAG	
<i>TGM1</i> EX15F	GGGAAGCCTCATGTAGGGAAG	64°C
<i>TGM1</i> EX15R	GTCCTTATCCGGCCTTCACTC	

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento.

Tabla 10. Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los 15 exones del gen *ALOX12B* [208].

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5´- 3´)	Ta
<i>ALOX12B</i> EX1F	CAGCTTTTCCAGAATTTGGCT	62°C*
<i>ALOX12B</i> EX1R	CAGCTCTCCAGCCTCTCCT	
<i>ALOX12B</i> EX2F	ATGAGCAGGGCCTAGGTGAG	60°C
<i>ALOX12B</i> EX2R	CTCTGGCTTGATGGGAGC	
<i>ALOX12B</i> EX3/4/5F	GGCACAGAAGCTGAACTCC	62°C*
<i>ALOX12B</i> EX3/4/5R	CTGGGGCTGTCTTGGAGG	
<i>ALOX12B</i> EX6F	CAGAGACCTAAGTGGATGGGG	60°C
<i>ALOX12B</i> EX6R	GGAGTCGGGGAGGAAAAC	
<i>ALOX12B</i> EX7/8F	CATAGTCTTCTTCTGTCCCATGC	60°C
<i>ALOX12B</i> EX7/8R	CAATCTCTCAAGGATAACGAGAGAC	
<i>ALOX12B</i> EX9/10F	CTTAGGAGTGTTTTACCTTCTCATACT	60°C
<i>ALOX12B</i> EX9/10R	CTTTCTAGACAGGAGAACCAACTTCAT	
<i>ALOX12B</i> EX11F	GAGCAGGATTGTTCTCCTGGAG	60°C
<i>ALOX12B</i> EX11R	CTAGAAGCTCCCCACACCCT	
<i>ALOX12B</i> EX12F	CAAGCCATCCTCTCCACTTC	60°C
<i>ALOX12B</i> EX12R	AGACTGCAATTCCGGATCAC	
<i>ALOX12B</i> EX13F	TTTGCAAACGGTGAGAGC	60°C
<i>ALOX12B</i> EX13R	GAGGCTGGACCAGGGATTAT	
<i>ALOX12B</i> EX14/15F	GGGAGTCCATCTCAGCGAC	60°C
<i>ALOX12B</i> EX14/15R	GAGAACGGAATCGCGGTG	

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento; *: con 2µL de DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%, que reduce estructuras secundarias ricas en GC.

Tabla 11. Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los 15 exones del gen *ALOXE3* [208].

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Ta
<i>ALOXE3</i> EX1F	CATCCTCAGCCCTACCCAG	60°C*
<i>ALOXE3</i> EX1R	GATCTCAAGAGTCCAGGAGGAA	
<i>ALOXE3</i> EX2F	ATTCATACAAAAGCCCGGTATG	60°C*
<i>ALOXE3</i> EX2R	CCCAGAGTTTCTGACCTCAATC	
<i>ALOXE3</i> EX3F	CACGTGTTTCACAGGGATGT	60°C
<i>ALOXE3</i> EX3R	TCCAAATAAGAGTCCTGATCCAA	
<i>ALOXE3</i> EX4/5F	CATCCTTAAATGCTACCCTATGTGA	60°C
<i>ALOXE3</i> EX4/5R	CATGTAGAGAGGGAAGACTGTGG	
<i>ALOXE3</i> EX6F	GTCAGTTCCTCCAGGCAGAG	60°C
<i>ALOXE3</i> EX6R	CTGTTTTTGTCCCCTCCTCA	
<i>ALOXE3</i> EX7F	TGATTCCCTACCTCATAGAGTTTTTG	60°C
<i>ALOXE3</i> EX7R	CAGGCCATTTCCATACCCT	
<i>ALOXE3</i> EX8/9/10F	CCATTAATTCAGGCACCAAGA	60°C
<i>ALOXE3</i> EX8/9/10R	CAGTGATTGTACAGGTGTTCTCACA	
<i>ALOXE3</i> EX11F	TGCTTGGTGAACCGAAGAAG	60°C
<i>ALOXE3</i> EX11R	CTAGGGTGTGAAAACACCTGAAAT	
<i>ALOXE3</i> EX12F	GAGTGAGTGGGACTTAAGGGAA	60°C
<i>ALOXE3</i> EX12R	TAACTGATGGGAGTAGGGTGTG	
<i>ALOXE3</i> EX13F	CGGTGTTCCCTACTTCCTCA	60°C
<i>ALOXE3</i> EX13R	CCACTCCAACCCCAAGTCTA	
<i>ALOXE3</i> EX14F	GATCCCCTCATTTCCCAACT	60°C
<i>ALOXE3</i> EX14R	TAAATCCCGTCGATCAGTCC	
<i>ALOXE3</i> EX15F	AGCCACCTTGACTGGATTTG	60°C
<i>ALOXE3</i> EX15R	CTGAGAACAGGGAGGATGGA	

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento; *: con 2µL de DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%, que reduce estructuras secundarias ricas en GC.

Tabla 12. Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los 12 exones del gen *CYP4F22* [72].

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Ta
<i>CYP4F22</i> EX1F	GTGTGCTGGGAACCTTCTGT	60°C*
<i>CYP4F22</i> EX1R	AAACTGCTTGCCCTCTCTGA	
<i>CYP4F22</i> EX2F	AGCCAACTGCCTGAAATCAT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX2R	TCAAATGACCCTTCCTCTGG	
<i>CYP4F22</i> EX3F	TGGATGACAGAGCAAGACTCC	60°C
<i>CYP4F22</i> EX3R	TCCACTTGTCACCTTTGCTG	
<i>CYP4F22</i> EX4F	GGCTGGGGCTTTAGAGAAGA	60°C
<i>CYP4F22</i> EX4R	AGCCTAACAAGGACCCGACT	
<i>CYP4F22</i> EX5F	GGTCCAGGCTCCAACATCAT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX5R	TCCCATAGGCCAGAGTTGTC	
<i>CYP4F22</i> EX6F	AATGGGGACAGGAGGCTTAT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX6R	CACCACGCCTAATGGAGTTT	
<i>CYP4F22</i> EX7F	TGCAGTTAGCCGAGATTGTG	60°C
<i>CYP4F22</i> EX7R	TGGATGTTGTGTCGTGACCT	
<i>CYP4F22</i> EX8F	TGTTTGAGGGTGAGGATGTG	60°C
<i>CYP4F22</i> EX8R	CCCCATTTTGTAGCTGAAG	
<i>CYP4F22</i> EX9F	GTGGCTCGGCCTCTAGTTAT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX9R	CCCCTGTGGACAATAGAGCA	
<i>CYP4F22</i> EX10F	ATGGCTCATGGGAACATCAT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX10R	AAATGGCTAAATGCGGAGTG	
<i>CYP4F22</i> EX11F	TGCTCCCCATCCATCTTTAC	60°C
<i>CYP4F22</i> EX11R	TGGTGCTCAATACCCAGGAT	
<i>CYP4F22</i> EX12F [^]	CCAGGATGCTTGCTTCATTT	60°C
<i>CYP4F22</i> EX12R [^]	GTCATCCAGGAGCTGAACCT	

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento; *: con 2µL de DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%, que reduce estructuras secundarias ricas en GC; [^]: diseñados posteriormente para nuestro trabajo.

Tabla 13. Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los 6 exones del gen *NIPAL4* [218].

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Ta
<i>NIPAL4</i> EX1F	CTCACCTCTTGCCCCTAGC	60°C
<i>NIPAL4</i> EX1R	GCCAGAACCCAGATCTTCAA	
<i>NIPAL4</i> EX2F	TTATCTGGCACGTGGTGGTA	60°C
<i>NIPAL4</i> EX2R	AGGTGGGATTCCAGATAGGG	
<i>NIPAL4</i> EX3F	GCCTGTGAGGAATCCAAGAG	60°C
<i>NIPAL4</i> EX3R	CTGGGCCTCAGATTCACACT	
<i>NIPAL4</i> EX4F	CTCCAGGGAGAGAGCGTATG	60°C
<i>NIPAL4</i> EX4R	GGCCTGCCTCTCTATTACCC	
<i>NIPAL4</i> EX5F	GAACAATGTCTCCCGTGGAT	60°C
<i>NIPAL4</i> EX5R	CCATACATATCAGGCCAGGAA	
<i>NIPAL4</i> EX6F	TTGGGGGTTTAAAAACCTAACC	60°C
<i>NIPAL4</i> EX6R	CAGTTGCACTGGAAAATAACCA	

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento.

Tras la puesta a punto de cada par de oligonucleótidos se rediseñaron varios de ellos por amplificar productos inespecíficos (tabla 14).

Tabla 14. Oligonucleótidos rediseñados para nuestro trabajo.

Localización	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Ta
<i>ALOX12B</i> EX1FN	CACCTCACCACTGCACCTC	60°C
<i>ALOX12B</i> EX1RN	GGGCCACAAAGACACACAG	
<i>ALOX12B</i> EX3F	CAAGGTGAGCCTTCCCCT	60°C
<i>ALOX12B</i> EX3R	AGGGCCAGAGCCATCACT	
<i>ALOX12B</i> EX4A/BF	CCTGGAGCACAGAAAAGAGG	60°C
<i>ALOX12B</i> EX4A/BR	AACCTCTGGGGCTGTCTTG	
<i>ALOX12B</i> EX11RN	CAGCAATTTGGTCTCCTTCAG	60°C
<i>CYP4F22</i> EX6Rseq	TCACCCTGGCCAGGAGCAG	60°C

F: oligo *forward* (sentido); R: oligo *reverse* (anti-sentido); Ta: temperatura de anillamiento.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (*Gibco-BRL*) preparados con tampón TBE (Tris 0.044M, ácido bórico 0.044M, EDTA 1.0mM pH 8.3).

La agarosa se disolvió en el TBE 0,5X calentando la mezcla en un horno microondas. Posteriormente se dejó enfriar hasta 50-60°C, se añadieron 5µL de bromuro de etidio al 2% por cada 100mL de gel y se depositó en la cubeta de electroforesis colocando a continuación el peine de pocillos.

Transcurridos aproximadamente 20 minutos, dependiendo de las condiciones ambientales del laboratorio, se solidificó el gel y la cubeta se sumergió en TBE 0,5X. Se procedió a cargar un volumen de 4µL de cada uno de los productos de PCR. El primer pocillo del gel se reservó para cargar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño que corresponde con el ADN del fago $\Phi X-174$ digerido con la endonucleasa *HaeIII*; esta digestión genera fragmentos de: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072Kb.

Para monitorizar la migración del ADN en el gel utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5Kb.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio, que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254nm).

Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (*Kodak DC40*) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (*Kodak Digital Science 1D*) (figura 24).

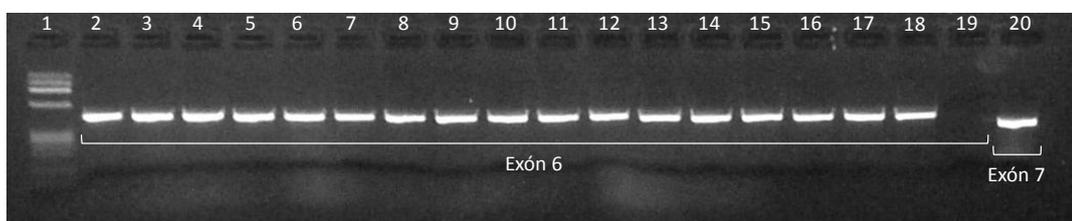


Figura 24. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a los exones 6 y 7 del gen *CYP4F22* en varios de los pacientes estudiados. (1: $\Phi X-174/HaeIII$, marcador de tamaño; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 20: pacientes; 19: control negativo de PCR del exón 6).

ANÁLISIS DE HETERODÚPLEX

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron sometidos a análisis por heterodúplex siguiendo la técnica descrita por Orita, con algunas modificaciones [226]. El gel fue teñido con nitrato de plata.

Los cambios de conformación del ADN pueden distinguirse por electroforesis debido a la diferente movilidad que presentan al aplicar un campo eléctrico.

El paso inicial del análisis por heterodúplex consiste en desnaturalizar el producto de PCR a 95°C y volver a renaturalizarlo, para permitir la formación de heterodúplex (secuencia de ADN que contiene al menos un par de bases desapareadas) (figura 25). En el caso de individuos heterocigotos, se generan cuatro moléculas distintas, dos heterodúplex y dos homodúplex. Heterodúplex y homodúplex migran de manera diferencial en geles de acrilamida, ya que el desapareamiento de una base causa una distorsión en la doble hebra de ADN [227, 228].

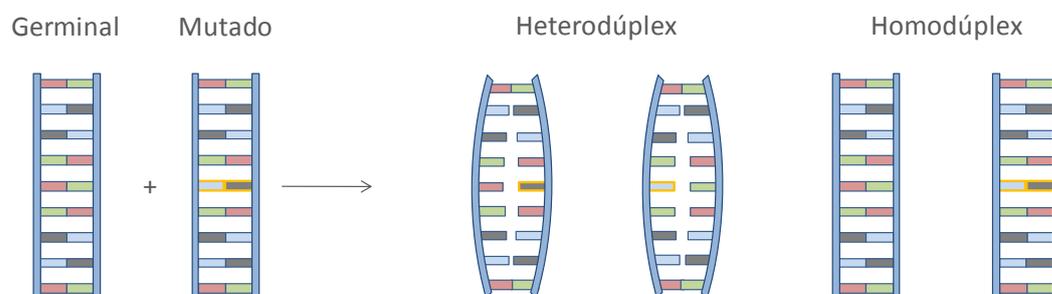


Figura 25. Formación de heterodúplex tras la desnaturalización y posterior renaturalización del producto de PCR en un individuo heterocigoto.

Los heterodúplex presentan una migración más lenta en el gel respecto a sus correspondientes homodúplex. Aunque idealmente las cuatro especies deberían ser distinguibles mediante la electroforesis, en la mayoría de los casos las moléculas heterodúplex son distinguidas de las homodúplex, pero no se diferencian entre sí.

Los geles para electroforesis fueron hechos con MDETM 2X (AT Biochem, Inc. USA), que es un polímero modificado derivado del vinilo. Se utilizaron las siguientes cantidades para preparar cada gel: agua destilada 7.705mL, formamida 99% 5.98mL, etilenglicol 99% 4.025mL, TBE 10X 2.415mL, MDETM 2X

20.125mL, TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina) 36.8μL y AMPS 25% 138μL. Los geles se dejaron solidificar durante 1 hora.

La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas (el tiempo varía dependiendo del tamaño del fragmento de PCR).

Para la tinción de plata se utilizó el *kit* comercial *DNA Silver Staining Kit* de *Amershan Pharmacia*, con un volumen de 250mL, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez teñidos los geles se conservaron plastificados con papel de celofán y secados en un horno de aire caliente. Los fragmentos de PCR de un mismo exón de distintos pacientes, con distintos patrones de migración en el gel de acrilamida, fueron posteriormente secuenciados.

En la figura 26 puede observarse el patrón de migración anómalo del exón 8 del gen *TGMI* en los pacientes cinco y seis (figura 26).

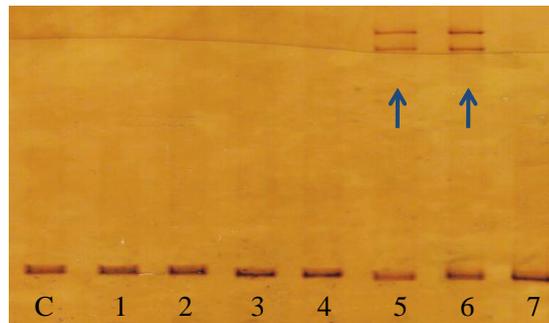


Figura 26. Heterodúplex correspondiente al exón 8 del gen *TGMI* en siete de los pacientes estudiados. (C: control; 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: pacientes).

La búsqueda de mutaciones mediante electroforesis en gel sensible a cambios de conformación tiene un límite de detección, aproximadamente del 90-95%.

Al ser el análisis de heterodúplex una técnica de búsqueda de mutaciones que no detecta bien las mutaciones en homocigosis, ya que los homodúplex tienen una conformación similar a la del fragmento normal, se optó por combinar cada producto de PCR de cada paciente con los de un control, con la intención de generar heterodúplex combinados.

Finalmente se decidió estudiar todos los exones mediante secuenciación directa para evitar el porcentaje de no detección de la técnica, ya que al ser las ictiosis congénitas incluidas en este trabajo autosómicas recesivas, esperamos el hallazgo de mutaciones en homocigosis, difícilmente distinguibles.

DHPLC

Se utilizó el sistema WAVE[®] (*Transgenomic*, Gran Bretaña), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase de reversa [229, 230].

Consiste en una columna llena de una matriz no porosa de bolas de polímeros de poliestireno-divinilbenceno (fase estacionaria). Estas bolas están unidas a cadenas de 18 carbonos (C-18) que forman puentes C-C. Por su naturaleza, las bolas de la columna son electrostáticamente neutras e hidrófobas, por lo que no reaccionan con los ácidos nucleicos. Para facilitar esta unión, se añade acetato de trimetilamonio (TEAA), que actúa como molécula puente que ayuda a la adsorción de los ácidos nucleicos a las bolas, ya que es hidrófoba y tiene carga positiva (figura 27).

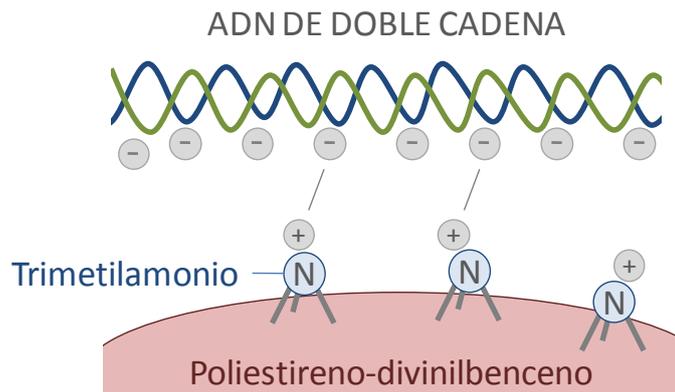


Figura 27. Composición química del interior de la columna utilizada en el sistema WAVE® (*Transgenomic*, Gran Bretaña).

Para poder realizar el análisis, debe permitirse la formación de los homodúplex y heterodúplex mediante desnaturalización de las muestras a 95°C y renaturalización de las mismas.

La resolución de las muestras se realiza aplicando una temperatura de desnaturalización específica para cada fragmento (temperatura de desnaturalización parcial), que depende de la longitud y de la secuencia de bases del fragmento que se quiere analizar (figura 28).

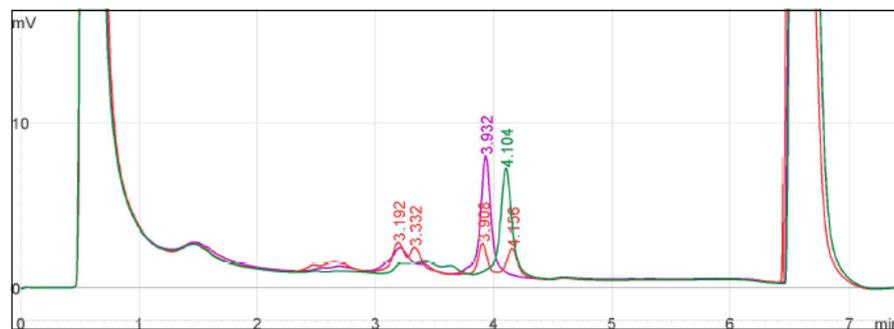


Figura 28. Discriminación alélica mediante la técnica dHPLC. Los individuos homocigotos aparecen como un único pico, mientras que los heterocigotos muestran un doble pico (línea roja). Los distintos casos de individuos homocigotos pueden diferenciarse por el tiempo de retención en la columna (líneas verde y morada).

La fase móvil del sistema consiste en una combinación de soluciones que extraen el ADN de la columna: TEAA 0.1M y acetonitrilo al 25%. A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrófoba entre la matriz y el ADN/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a eluirse de la columna, en primer lugar los heterodúplex (que presentan una unión más débil) y posteriormente los homodúplex (que quedan retenidos con más fuerza y, por tanto, son los últimos en salir de la columna).

Los fragmentos de ADN eluidos pasan por un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, y el *software* de análisis (*Navigator*, Sistema WAVE[®], *Transgenomic*) lo representa en forma de picos, correspondientes al tiempo que tarda cada fragmento en eluirse de la columna, llamado también tiempo de retención.

Los tiempos de retención permiten obtener una alta rapidez de análisis (unos 8 minutos por muestra) y sensibilidad. En la mayoría de los casos los perfiles de elución de las muestras con mínimos cambios en la secuencia, como cambios de una sola base o pequeñas inserciones o pérdidas, son distintos de los de las muestras que contienen secuencias homocigotas.

Mediante esta técnica se estudió el exón 11 del gen *TGMI*, para realizar un estudio poblacional y comprobar si una de las alteraciones encontradas en el análisis aparecía o no en controles sanos, en cuyo caso sería catalogada como polimorfismo o causante de la enfermedad. Para llevar a cabo el experimento se empleó la misma secuencia de oligonucleótidos que para amplificar el exón 11 del gen mediante PCR. La temperatura de desnaturalización parcial ajustada para el exón estudiado fue de 61.6°C.

PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

La purificación de los amplicones se llevó a cabo inicialmente mediante el *kit* comercial *GeneClean turbo kit*[®] (BIO 101 Systems, Reino Unido) que permite eliminar fragmentos de ADN de un tamaño de entre 0,1Kb y 300Kb, y en la parte final de este trabajo se empleó el *kit* ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA) con el que se purifican productos de PCR de entre 100pb hasta 20Kb.

En aquellos casos en los que los oligonucleótidos anillaban a su vez en otras regiones genómicas y amplificaban fragmentos inespecíficos, las bandas correspondientes al tamaño deseado fueron aisladas físicamente del gel y purificadas con el *kit GeneClean Spin Kit*[®] (QbioGene).

Mediante estos métodos de purificación se separaron los fragmentos de ADN de interés, del exceso de oligonucleótidos procedente de la reacción de PCR. Este tratamiento es necesario, previo a la secuenciación.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

La secuenciación automática de los fragmentos de ADN amplificados por PCR a partir del ADN genómico y posteriormente purificados, se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Inc.) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, usando el cebador específico correspondiente, así como terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Se preparó una muestra con el oligonucleótido sentido y otra con el oligonucleótido antisentido de cada producto de PCR, a una concentración de 3pmol en un volumen de 2µL. El ADN se preparó a una concentración de 40-60ng para un volumen final de 8µL.

La reacción de secuencia, basada en el método de enzimático de Sanger o de terminadores de cadena [231], se llevó a cabo en un termociclador automático y fue purificada con EDTA y etanol. El producto purificado fue resuspendido en 10µL de formamida.

Una vez preparada la reacción enzimática, se separan los fragmentos mediante electroforesis capilar; las bandas pasan a través de un láser de argón que excita las distintas moléculas fluorescentes. La emisión de estas moléculas se detecta a través de un filtro y, mediante un tratamiento informático, se le asigna a cada emisión una base determinada, constituyéndose la secuencia del fragmento analizado (figura 29).

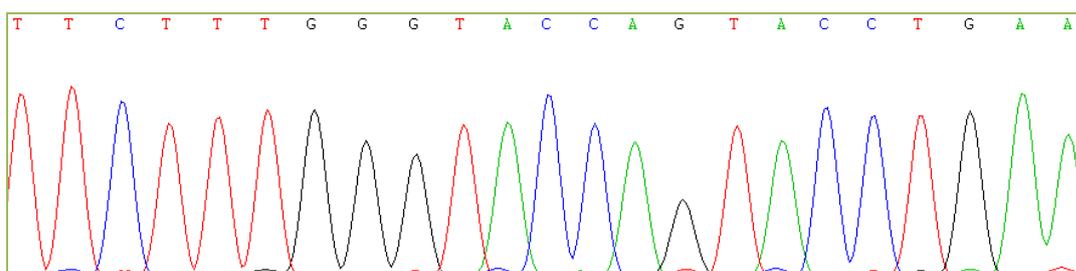


Figura 29. Secuencia obtenida mediante electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer, correspondiente al exón 6 del gen *ALOXE3*.

ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

El análisis de las secuencias obtenidas se ha llevado a cabo usando diferentes programas informáticos:

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó con ayuda del programa *EditView ABI Automated DNA Sequence Viewer 1.0* (Perkin Elmer) y *Chromas lite 2.01* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

La homología con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) se realizó con el programa *BLAST* de los servidores: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start> y <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

El alineamiento de secuencias de ADN se hizo con el programa *CLUSTALW* (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>).

El diseño de oligonucleótidos específicos para PCR o secuenciación se llevó a cabo con el programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

ESTUDIO *IN SILICO*

Posteriormente se realizó un estudio *in silico* de las mutaciones de cambio de aminoácido (*missense*) no descritas, buscando conocer el comportamiento teórico de las mismas en los genes y su grado de implicación en la función de la proteína. Para llevarlo a cabo se usaron los siguientes programas informáticos: Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), SIFT (<http://sift-dna.org>) y SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>).

POLYPHEN~2

PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping*) predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas.

Para llevar a cabo la predicción realiza un alineamiento de secuencias pertenecientes a proteínas homólogas en las especies que se encuentran descritas en BLAST. El resultado del mismo es empleado por el *software* PSIC (*Position Specific Independent Counts*) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz (valores del perfil) son ratios logarítmicos que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo).

PolyPhen-2 analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas. Los resultados pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína.
- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura proteica.
- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico.
- Desconocido: en algunos casos, cuando por carencia de datos no se puede hacer una predicción.

PolyPhen-2 también muestra un número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda para el análisis de la conservación interespecie ordenadas de mayor a menor homología en la secuencia de la proteína dada.

SIFT

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína y predice si estos cambios provocarán un efecto en el fenotipo. Se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que los cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína.

Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y forma un alineamiento múltiple de éstas y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento, realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la proteína.

Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas “no toleradas” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido. Esta premisa se realiza calculando las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas y las puntuaciones mayores o iguales a 0,05, “toleradas” o neutras.

La precisión en las predicciones de SIFT oscila entre 60-80%, obteniéndose un 30% de falsos positivos, aproximadamente. No obstante, la precisión de las predicciones depende del alineamiento que se obtenga en cada caso.

SNPs3D

SNPs3D (*Single nucleotide polymorphisms 3D*) basa su predicción en la hipótesis de que muchos SNPs patogénicos afectan a la función de la proteína disminuyendo su estabilidad. Emplea el *software SVM (Support Vector Machine)* para encontrar el patrón de diferenciación entre los SNPs asociados a enfermedad y los neutros. La tasa de falsos positivos y negativos es del 15% y 26% respectivamente. También emplea un segundo modelo que se basa en el análisis de la homología de secuencia en familias de proteínas humanas. El nivel de conservación de una posición y la probabilidad de observar una variación en una familia hace posible distinguir entre mutaciones patogénicas y neutras, con unas tasas de falsos positivos y negativos del 10 y del 20%, respectivamente.

Un resultado positivo para el valor de SVM indica que se trata de una variante clasificada como neutra, mientras que un valor negativo la identifica como un cambio patogénico. Cuanto mayor es el valor, más probable es la clasificación.

La precisión es significativamente mayor cuando los valores están por encima de 0,5 o por debajo de -0,5. Para las variantes que afectan más a la función de la proteína que a la estabilidad, el modelo de estabilidad es positivo y el modelo del perfil debe ser negativo. La precisión es significativamente mayor cuando los dos métodos coinciden.

RESULTADOS



4. RESVLTADOS

En este estudio han participado 29 familias con al menos un individuo diagnosticado de ictiosis congénita autosómica recesiva. Nuestro trabajo se dividió en dos partes: la primera consistió en el análisis del gen *TGMI* en los 29 probandos seleccionados y en el estudio familiar en los casos con mutación (con el objetivo de detectar posibles portadores), ya que fue el primer gen descrito asociado a la enfermedad y el que aparece mutado en un mayor número de casos; y la segunda parte, que abarcó el estudio de los genes *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*, en aquellos pacientes en los que no se detectaron mutaciones patogénicas en el primer gen, o en los que se detectaron variantes de significado desconocido.

El gen *ABCA12* no se eligió como candidato a estudio debido al bajo porcentaje de mutaciones detectadas hasta el momento en pacientes con IL y EIC; y al gran tamaño del gen. Se pospondrá su análisis a la espera de los resultados obtenidos en la búsqueda de mutaciones en el resto de genes seleccionados.

4.1 ANÁLISIS DEL GEN *TGMI*

El gen *TGMI* está situado en el cromosoma 14q11.2 y tiene 15 exones. Codifica la proteína transglutaminasa 1, que es una de las tres transglutaminasas que se encuentran en la epidermis. En los pacientes con mutaciones en el gen *TGMI* la actividad de la enzima está disminuida o abolida. Las mutaciones en *TGMI* son la causa más común de ICAR.

En nuestro estudio se detectaron variantes nucleotídicas en este gen en 12 de los 29 pacientes analizados; estos resultados se muestran en la tabla 15 (tabla 15).

Tabla 15. Variantes nucleotídicas detectadas en el gen *TGMI* y efecto de las mismas sobre la proteína.

Caso	Mutación	Cambio en la proteína
2371	c.1631A>G (exón 11) Homocigosis	p.Y544C
2399	c.1223_1227delACACA (exón 8) Homocigosis	p.D408VfsX21
2527	c.1223_1227delACACA (exón 8) Homocigosis	p.D408VfsX21
17596	c.984+1G>A (intrón 6) Homocigosis	Procesamiento intrónico
	c.1559A>G (exón 11) Homocigosis	p.E520G
19848	c.376C>T (exón 3) Heterocigosis	p.R126C
	c.919C>G (exón 6) Heterocigosis	p.R307G
20503	c.2440C>T (exón 15) Heterocigosis	p.R814X
21189	c.1-915_-916insC (5' UTR) Heterocigosis	-
22223	c.125C>A (exón 2) Heterocigosis	p.S42Y
24040	c.625G>A (exón 4) Heterocigosis	p.G218S
	c.2116G>T (exón 14) Heterocigosis	p.E706X
24041	c.877-2A>G (intrón 5) Heterocigosis	Procesamiento intrónico
	c.1061C>T (exón 7) Heterocigosis	p.A354V
25459	c.424C>T (exón 3) Heterocigosis	p.R142C
	c.1472C>T (exón 10) Heterocigosis	p.T491M
26040	c.449T>C (exón 3) Heterocigosis	p.L150P
	c.919C>G (exón 6) Heterocigosis	p.R307G
	c.1571G>T (exón 11) Heterocigosis	p.G524V

c.: ADNc; p.: proteína.

Las mutaciones detectadas en los pacientes se describen con más detalle a continuación:

CASO 2371

Se trata de una mujer que presenta un cuadro clínico de IL, con presencia de grandes escamas de color marrón que cubren toda la superficie corporal; cursa un grave ectropión y discreta eritrodermia y alopecia.

El análisis del gen *TGMI* en este caso mostró una mutación en homocigosis en el exón 11, que cambia el aminoácido tirosina por cisteína en la posición 544 de la proteína (**c.1631A>G p.Y544C**). El análisis de los padres de la paciente, ambos sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, mostró la presencia de la mutación p.Y544C en heterocigosis (figura 30).

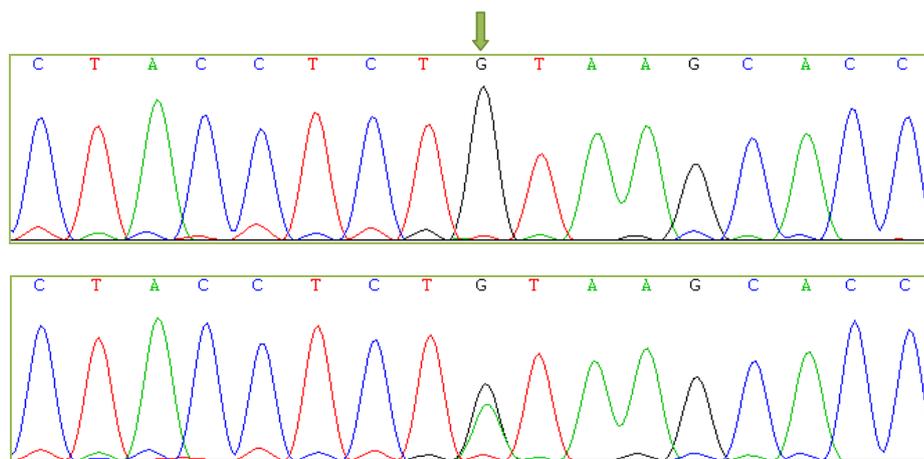


Figura 30. Secuencia del exón 11 del gen *TGMI* de la paciente (parte de arriba) que porta la mutación c.1631A>G en homocigosis y de uno de sus padres (parte de abajo) heterocigoto para la alteración.

Esta mutación fue descrita por primera vez en el año 2009 [56]. Al situarse en el dominio catalítico de la enzima y tratarse de un residuo muy conservado a lo largo de la evolución, fue considerada como mutación patogénica (figura 31).

<i>Homo sapiens</i>	534	SNMREDITYL Y KHPEGSDAER	554	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	532	SNMQDDVTHI Y KHPEGSEAER	552	80%
<i>Macaca mulatta</i>	535	SNMREDITYL Y KHPEGSDAER	555	100%
<i>Mus musculus</i>	533	SNNREDITHI Y KHPEGSEAER	553	82%
<i>Rattus norvegicus</i>	542	SNMREDITHI Y KHPEGSEAER	562	89%

Figura 31. Comparación del aminoácido tirosina de la posición 544 de la proteína *tgml* en varias especies, que muestra que es un residuo conservado a lo largo de la evolución. (%: porcentaje de similitud con *tgml* en la especie humana)

Dada la diferencia estructural entre dichos aminoácidos, el anillo aromático de la tirosina y la molécula lineal y azufrada de la cisteína, podríamos pensar que este cambio participa en la estabilidad de la hendidura donde se localiza el sitio activo.

Para poder confirmar la verdadera naturaleza de la mutación, realizamos un estudio poblacional en que se llevó a cabo la búsqueda de la mutación c.1631A>G p.Y544C en 50 individuos sanos mediante PCR del exón 11 y secuenciación automática del producto amplificado. El resultado de este estudio reveló que ninguno de los controles analizados presentaba la alteración. Aunque sería conveniente aumentar el número de controles estudiados, el analizar 100 alelos y no detectar la mutación en ninguno de ellos, podría indicar que no se trata de un polimorfismo.

También se realizó un estudio *in silico* con la intención de predecir si su efecto es patogénico y en consecuencia, capaz de inducir la expresión fenotípica de la enfermedad. Para llevarlo a cabo, usamos las herramientas informáticas descritas en el apartado de material y métodos (tabla 16).

Tabla 16. Estudio *in silico* de la mutación p.Y544C.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-4,29

Los programas de predicción utilizados en este trabajo consideran a la mutación p.Y544C como variante patogénica; teniendo siempre en cuenta que los datos que aportan simplemente dan información teórica, siempre es necesaria la realización de estudios funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* y amplios estudios poblacionales, para concluir su verdadera naturaleza.

CASO 2399

Se trata de una mujer nacida como bebé colodión diagnosticada de IL, que cursa con grandes escamas de color marrón y leve eritrodermia. Presenta ectropión, severa hiperqueratosis palmoplantar y alopecia.

El análisis del gen *TGMI* reveló la presencia de la mutación **c.1223_1227delACACA p.D408VfsX21**, situada en el exón 8 en homocigosis y que consiste en la pérdida de cinco nucleótidos, lo que genera un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro, dando lugar a una proteína truncada en su dominio catalítico (figura 32).

Esta mutación ha sido descrita anteriormente en la literatura [55]. Por su naturaleza, es considerada patogénica y causante del fenotipo de la paciente.

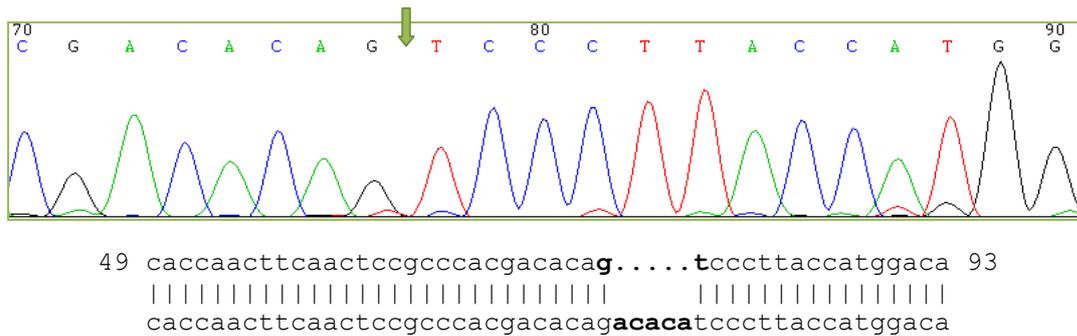


Figura 32. Secuenciación automática del exón 8 del gen *TGMI* en la paciente 2399 (parte de arriba) y su comparación con la secuencia consenso de referencia del gen (abajo).

Seguidamente se realizó el estudio familiar, para el que dispusimos de las muestras de ADN de la madre, fallecida en la actualidad (I-2) y una de las hermanas de la paciente (II-2), ambas sin manifestaciones clínicas de la enfermedad. El resultado de este análisis mostró que ambas eran heterocigotas para la mutación (c.1223_1227delACACA). En la figura 33 puede observarse el árbol genealógico de la paciente (figura 33).

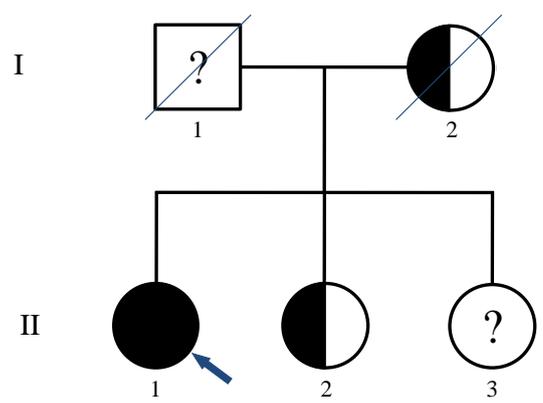


Figura 33. Árbol genealógico de la paciente 2399.

Este resultado confirma el patrón de herencia autosómico recesivo, siendo necesario que la alteración aparezca en homocigosis para que se desarrolle la enfermedad.

CASO 2527

El caso 2527 se trata de un varón nacido como bebé colodión de padres consanguíneos y diagnosticado de IL, que cursa con grandes escamas de color marrón que le cubren toda la superficie del cuerpo. Presenta además grave ectropión, hiperqueratosis palmoplantar y alopecia. En la niñez podía apreciarse leve eritrodermia.

El análisis del gen *TGM1* en este caso mostró la misma mutación en homocigosis que la paciente anterior (2399), situada en el exón 8 del gen (**c.1223_1227delACACA p.D408VfsX21**).

En el caso 2527 se analizaron todos los miembros de la familia, ninguno con manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los padres (I-1, I-2) y la hermana del paciente (II-2) son portadores de la mutación en heterocigosis y el hermano (II-3) es homocigoto normal (no portador) (figuras 34 y 35).

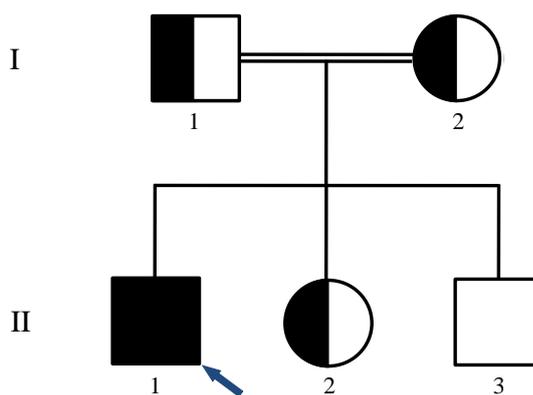


Figura 34. Árbol genealógico del paciente 2527.

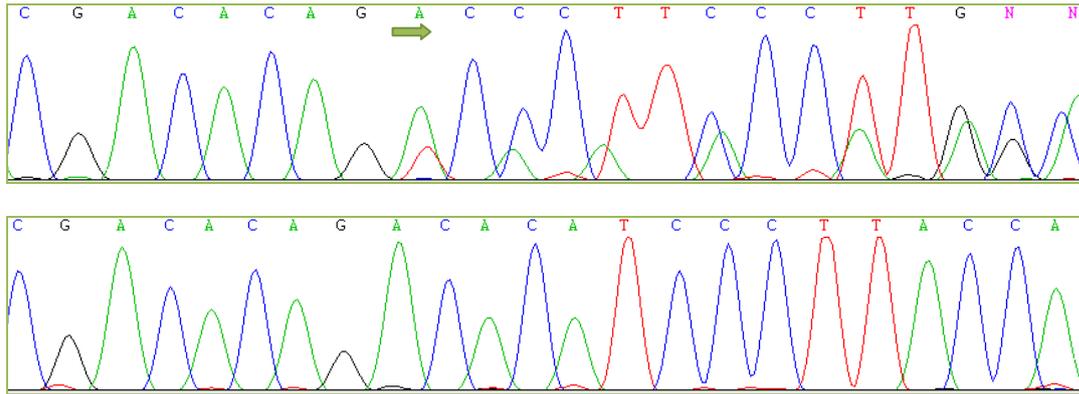


Figura 35. Secuenciación del exón 8 del gen *TGM1* en la hermana (arriba) y hermano (abajo) del paciente 2527.

CASO 17596

Se trata de un varón nacido como bebé colodión diagnosticado de EIC. Presenta eritrodermia generalizada con descamación fina y blanquecina. No cursa ectropión ni hiperqueratosis palmoplantar ni alopecia.

El estudio del gen *TGM1* mostró la mutación en homocigosis **c.984+1G>A** situada en la posición +1 del exón 6, concretamente en la región crítica de procesamiento del intrón 6 (figura 36). Esta mutación se describió por primera vez en el año 2009 [55].

Las mutaciones en estas regiones de procesamiento intrónico se consideran patogénicas por definición, ya que derivan en un fallo en la maduración del ARNm dando lugar a proteínas anómalas. En este caso impediría el procesamiento del intrón 6, apareciendo un codón de parada prematuro, lo que produciría una proteína truncada que pierde parte del dominio catalítico. Para confirmar el verdadero efecto que esta mutación provoca en la proteína, sería necesario realizar un estudio del ARNm del paciente.

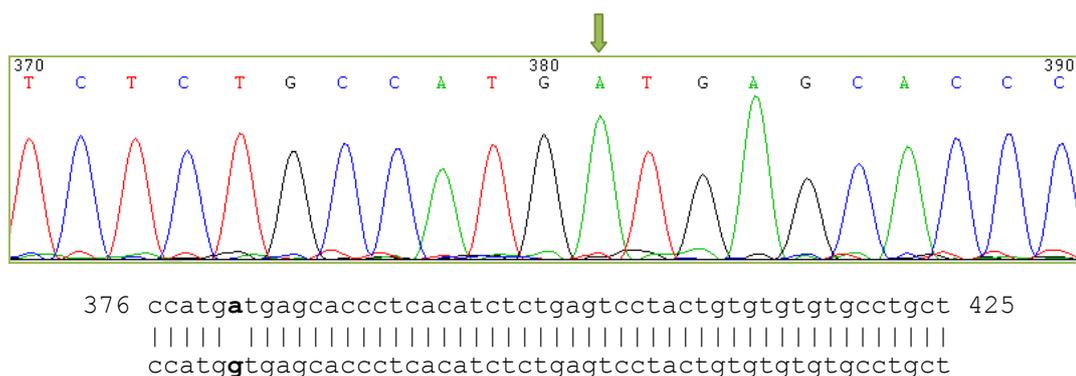


Figura 36. Secuenciación del exón 6 del gen *TGMI* en el paciente 17596, donde se localiza la mutación c.984+1G>A en homocigosis (parte de arriba) y comparación esta secuencia con la secuencia consenso de referencia del gen (parte de abajo).

También se detectó en homocigosis la mutación **c.1559A>G** (figura 37), situada en el exón 11, que provoca el cambio del aminoácido ácido glutámico por glicina en la posición 520 de la proteína (**p.E520G**). Esta última alteración fue descrita como patogénica por Esposito y colaboradores en el año 2001 [232].

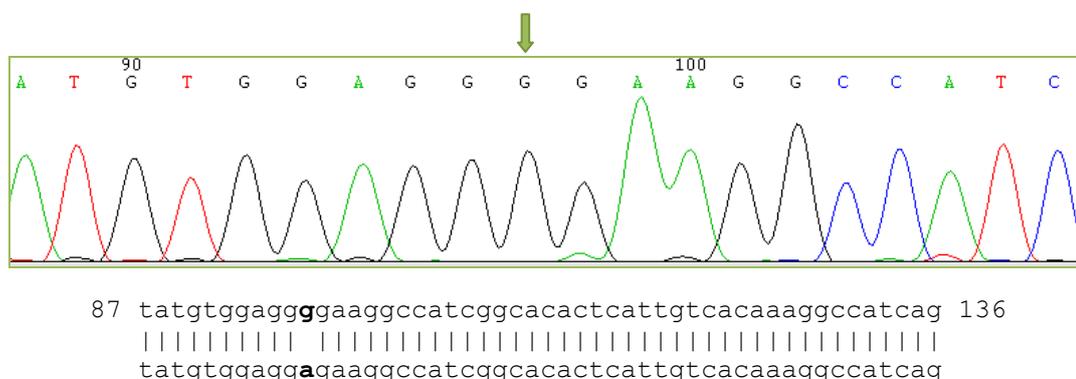


Figura 37. Secuenciación del exón 11 del gen *TGMI* en el paciente (caso 17596) donde se localiza la mutación c.1559A>G en homocigosis (parte de arriba) y comparación de esta secuencia con la secuencia consenso de referencia del gen (parte de abajo).

La presencia de dos mutaciones en homocigosis sugiere que alguna de ellas puede tratarse de un polimorfismo. El hecho de que dos mutaciones patogénicas aparezcan segregadas juntas en el mismo alelo, siendo las ictiosis autosómicas recesivas entidades de baja incidencia poblacional, es poco probable. En este caso, consideramos que la mutación patogénica causante de la enfermedad es la situada en la posición +1 del exón 6, porque la alteración c.1559A>G p.E520G no está situada en un aminoácido conservado entre otras transglutaminasas conocidas. Por otro lado, si se confirma que la alteración c.984+1G>A es la causante de un procesamiento aberrante del ARNm, produciendo un codón de parada prematuro, la mutación del exón 11 nunca llegaría a expresarse.

Para comprobar nuestra hipótesis se llevo a cabo un estudio poblacional. A pesar de que Esposito y colaboradores realizaron la búsqueda de la alteración c.1559A>G p.E520G en 50 individuos sanos, decidimos aumentar la muestra a 100 controles, analizando mediante dHPLC el exón 11 del gen *TGMI* en 100 alelos de la población control. El resultado fue la aparición de la alteración en heterocigosis en uno de ellos (figura 38). El que aparezca el cambio en un individuo sano sugiere que se trata de un polimorfismo, aunque habría que detectarlo en homocigosis para descartar que esté implicado en el desarrollo de la enfermedad.

El segundo paso a seguir sería el estudio del ARNm, para comprobar que realmente la eliminación del intrón 6 del ARNm maduro no se está realizando correctamente. El método más sencillo consiste en estudiar el ARNm de una muestra de tejido del paciente en el que el gen de la transglutaminasa 1 se expresara, por ejemplo, una biopsia de piel, pero no se dispuso de dicha muestra.

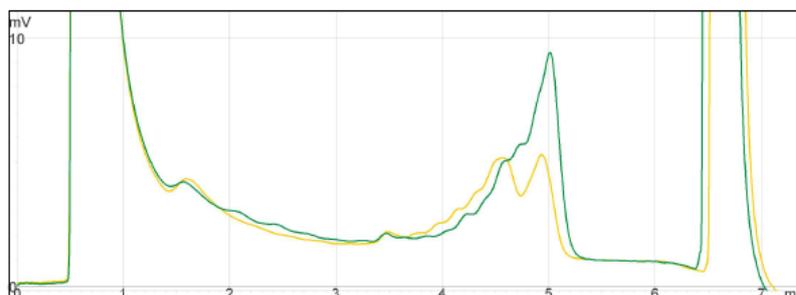


Figura 38. Cromatografía obtenida mediante dHPLC del exón 11 del gen *TGMI* del paciente 17596 (en color verde) y de un control heterocigoto para la alteración (en amarillo).

También se realizó un estudio *in silico* con la intención de predecir si su efecto es patogénico y en consecuencia, capaz de inducir la expresión fenotípica de la enfermedad. Para llevarlo a cabo, usamos las herramientas informáticas descritas en el apartado de material y métodos (tabla 17).

Tabla 17. Estudio *in silico* de la mutación p.E520G.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Posiblemente patogénica	0,95	Tolerada	1	Patogénica	-0,52

El programa SIFT consideró a la variante p.E520G como tolerada por la proteína; mediante el alineamiento de secuencias que realiza determina que este aminoácido no está conservado a lo largo de la evolución; por lo tanto, los cambios en esta posición no afectarán a la funcionalidad de la proteína. Los programas Polyphen-2 y SNPs3D, la consideraron como una variante posiblemente patogénica y patogénica, respectivamente, pero con unos valores de predicción muy cercanos a la neutralidad.

CASO 19848

Se trata de una niña nacida como bebé colodión. En la actualidad las lesiones cutáneas han desaparecido, por lo que ha sido diagnosticada de bebé colodión autorresolutivo; no se aprecian eritrodermia, descamación, hiperqueratosis palmoplantar ni alopecia.

En este caso se detectaron en el gen *TGM1* dos mutaciones en heterocigosis, la **c.376C>T p.R126C** situada en el exón 3 y la **c.919C>G p.R307G** localizada en el exón 6 (figura 39). Ambas mutaciones fueron descritas por primera vez en el año 2006 [43] y en 2009 fueron caracterizadas a nivel funcional y consideradas variantes patogénicas [233].

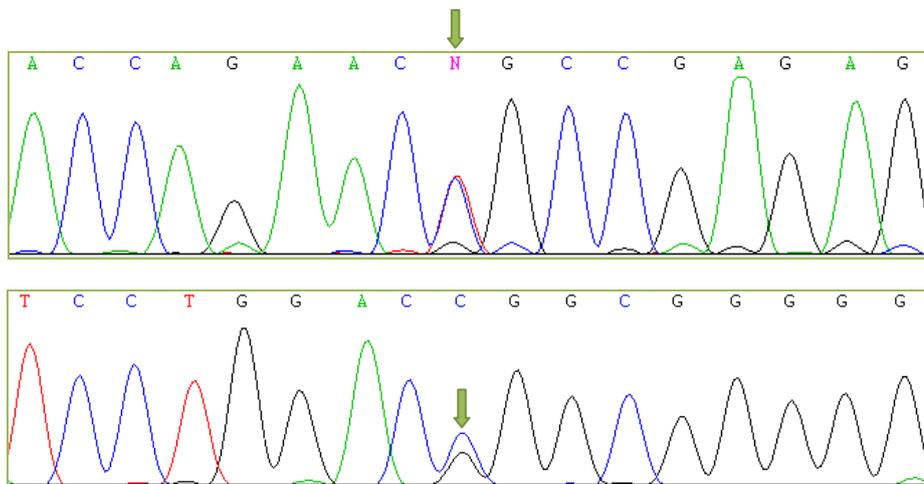


Figura 39. Secuenciación del exón 3 del gen *TGM1* donde se localiza la mutación c.376C>T (parte de arriba) y del exón 6 en el que se localiza la mutación c.919C>G (parte de abajo) en la paciente 19848.

El análisis de los padres en este caso es clave para comprobar si ambas mutaciones están en el mismo cromosoma (*cis*) o en diferente (*trans*).

La búsqueda de las mutaciones en los padres, ambos sanos, confirmó el patrón de herencia y explicó la aparición del fenotipo de la probando, ya que el padre es el portador de la mutación c.376C>T y la madre la portadora de la mutación c.919C>G, ambos en heterocigosis (figura 40).

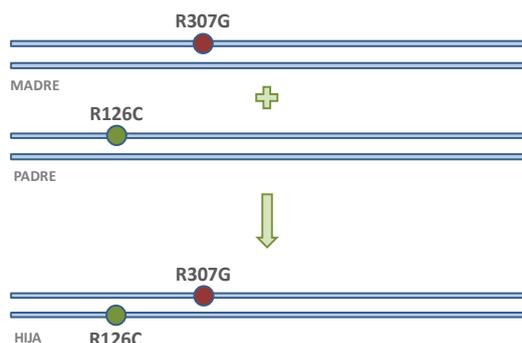


Figura 40. Representación esquemática de la disposición de las dos variantes nucleotídicas detectadas en la paciente 19848 en el gen *TGMI*, comprobada a partir del estudio de las mismas en sus padres.

A pesar de que estas dos mutaciones ya habían sido previamente descritas como mutaciones patogénicas se realizó el estudio *in silico* de las mismas (tablas 18 y 19).

Tabla 18. Estudio *in silico* de la mutación p.R126C.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Neutra	1,21

Tabla 19. Estudio *in silico* de la mutación p.R307G.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	0,96	Tolerada	1	Patogénica	-0,64

En el estudio *in silico* realizado de la mutación c.376C>T p.R126C el programa SNPs3D la valoró como variante neutra, ya que en el alineamiento de secuencias que realiza con otras familias de proteínas relacionadas determina que no se trata de un residuo conservado entre ellas. Los programas PolyPhen-2 y SIFT, la consideraron probablemente patogénica y no tolerada por la proteína.

En el caso de la segunda mutación (c.919C>G p.R307G), el programa SIFT la catalogó como variante tolerada por la proteína, frente a los otros dos programas utilizados.

CASO 20503

Se trata de un niño nacido de padres no consanguíneos con sospecha de IL, que en la actualidad cursa con grandes escamas. No se dispusieron de más datos clínicos.

En este caso se detectó en heterocigosis la mutación **c.2440C>T p.R814X** localizada en el exón 15 del gen, que provoca el cambio del aminoácido arginina de la posición 814 de la proteína por un codón de parada (figura 41). Este cambio se sitúa a tan sólo 4 codones del codón de parada de la proteína. No se ha detectado en este caso ningún otro cambio nucleotídico, ni patogénico ni de significado desconocido que pueda ser detectado mediante secuenciación directa. Esta variante no está descrita anteriormente en la literatura.

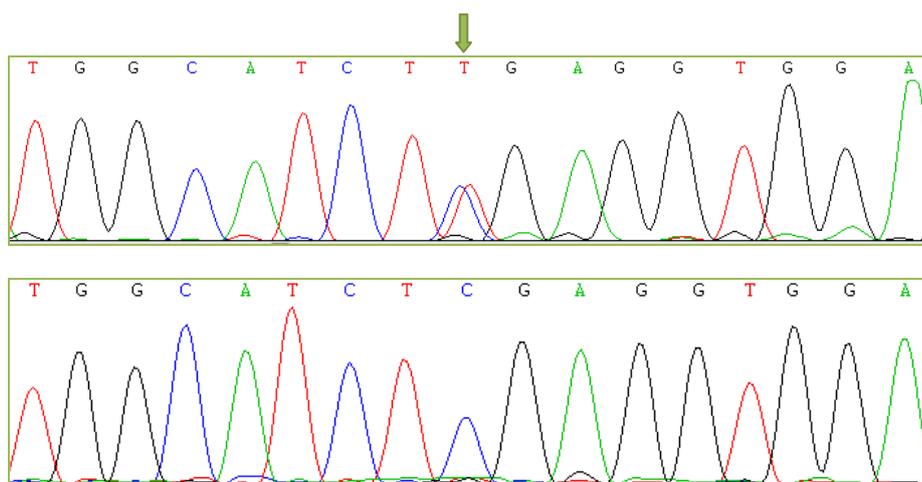


Figura 41. Secuenciación del exón 15 del gen *TGM1* en el paciente 20503 en el que se localiza la mutación c.2440C>T en heterocigosis (parte de arriba) y secuencia de este mismo exón en su hermana (parte de abajo).

La madre del paciente es portadora de esta misma alteración en heterocigosis; en el padre y una hermana del mismo no se detecta dicha variante (figura 41).

No es posible la utilización de los programas informáticos de predicción, ya que éstos sólo estiman la naturaleza de aquellas variantes que dan como resultado un cambio de aminoácido en la proteína.

Al no conocer la verdadera naturaleza de esta variante nucleotídica (c.2440C>T p.R814X), se prosiguió con el estudio del resto de genes, considerándola de significado desconocido.

CASO 21189

Se trata de una niña, diagnosticada de IL, que cursa con escamas grandes de color amarillo. No se aprecia eritrodermia ni ectropión; sí presenta una leve alopecia.

En este caso se detectó la variante nucleotídica **c.1-915_-916insC**, en heterocigosis y localizada en la región 5' UTR del gen. Este cambio consiste en la inserción de una citosina entre las posiciones -915 y -916 desde el inicio de la transcripción, zona donde se localiza el promotor del gen (figura 42).

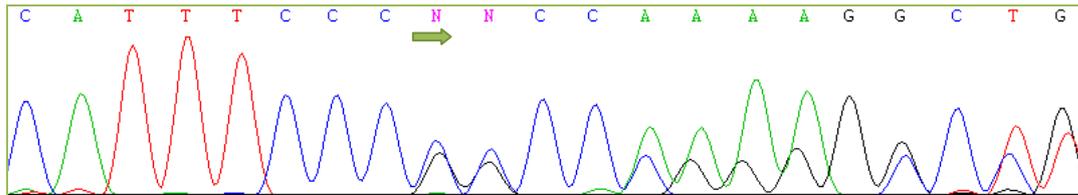


Figura 42. Secuenciación del promotor del gen *TGM1* del caso 21189 donde se detecta en heterocigosis la variante c.1-915_-916insC.

No se detectaron en este caso más cambios nucleotídicos a lo largo del gen, ni patogénicos ni de significado desconocido, detectables mediante secuenciación automática y tampoco dispusimos de más miembros de la familia.

La variante c.1-915_-916insC no está descrita anteriormente en la literatura; por lo tanto, sería conveniente realizar estudios poblacionales y un estudio funcional para comprobar su verdadera naturaleza; hasta entonces, debe ser considerada como variante de significado desconocido, por lo que se prosiguió con el estudio del resto de genes.

Al igual que sucedía en el caso 20503, la presencia de una única mutación en heterocigosis, no sería suficiente para poder explicar la aparición de la enfermedad.

No es posible realizar estudios *in silico* ya que esta variante se sitúa fuera de la región codificante del gen.

CASO 22223

Se trata de un varón nacido como bebé colodión, en la actualidad no cursa descamación ni ninguna otra manifestación clínica de ictiosis, salvo hiperqueratosis palmoplantar. Ha sido diagnosticado como bebé colodión autorresolutivo.

En este caso se detecta en heterocigosis la mutación **c.125C>A p.S42Y**, situada en el exón 2 del gen *TGMI* (figura 43). Esta mutación fue descrita por primera vez en el año 1995 [45].

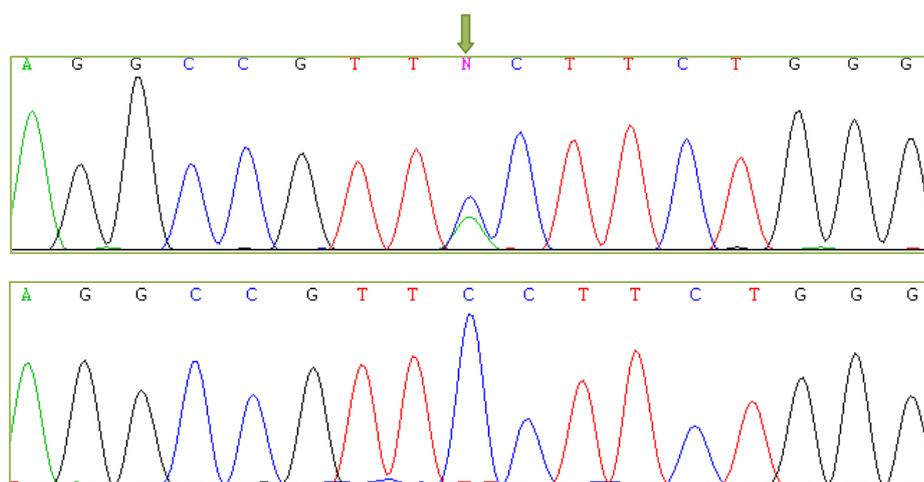


Figura 43. Secuenciación del exón 2 del gen *TGMI* del caso 22223 donde se detecta en heterocigosis la variante c.125C>A (parte de arriba) y secuencia de este mismo exón en su padre, homocigoto normal (parte de abajo).

El estudio de los padres mostró que la madre del paciente 22223, que no presentaba manifestaciones clínicas de la enfermedad, era portadora de la variante c.125C>A p.S42Y en heterocigosis y en el padre no se detectó dicha variante (figura 43).

No se identificó en este caso ninguna otra mutación, ni patogénica ni de significado desconocido detectable mediante las técnicas utilizadas en este trabajo.

También se realizó el estudio *in silico* de la variante c.125C>A p.S42Y con la intención de predecir su efecto teórico sobre la proteína (tabla 20).

Tabla 20. Estudio *in silico* de la mutación p.S42Y.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	0,97	No tolerada	0,33	*	

*No se aporta predicción fiable.

En este estudio *in silico* únicamente se obtuvieron resultados de los programas PolyPhen-2 y SIFT, que consideraron a la variante p.S42Y como probablemente patogénica y no tolerada por la proteína respectivamente; el programa SNPs3D no aportó una predicción fiable.

Al igual que en los casos anteriores, la presencia de una única mutación en heterocigosis en el gen *TGMI*, no es suficiente para poder explicar la aparición del fenotipo en estos pacientes. Por otro lado, aunque esta mutación ha sido descrita como variante patogénica, no se han realizado estudios funcionales de la misma que corroboren su naturaleza. Por estas razones, en este trabajo, se pone en duda su patogenicidad, considerándola de significado desconocido y prosiguiendo con el estudio del resto de los genes.

CASO 24040

Se trata de un varón diagnosticado de IL, que nació como bebé colodión y que cursa con grandes escamas de color marrón, ectropión y alopecia. No se observan en este paciente eritrodermia ni hiperqueratosis.

El análisis del gen *TGMI* mostró en este caso la presencia de dos mutaciones en heterocigosis: la **c.625G>A p.G218S** situada en el exón 4 y la **c.2116G>T p.E706X** localizada en el exón 14 del gen (figura 44). La primera de ellas fue descrita por primera vez en la literatura en el año 1997 y fue considerada patológica [49]. La segunda de ellas se describe por primera vez en este trabajo doctoral.

La mutación p.G218S consiste en un cambio del aminoácido no polar glicina de la posición 218 de la proteína por un residuo de serina, aminoácido polar. La posición 218 se localiza en la región próxima al dominio catalítico de la enzima.

La segunda mutación detectada en este caso fue la c.2116G>T p.E706X, situada en el exón 14 del gen, y consiste en la sustitución del aminoácido ácido glutámico de la posición 706 por un codón de parada y, por tanto, da lugar a una proteína truncada, que pierde parte de su dominio barril β 2.

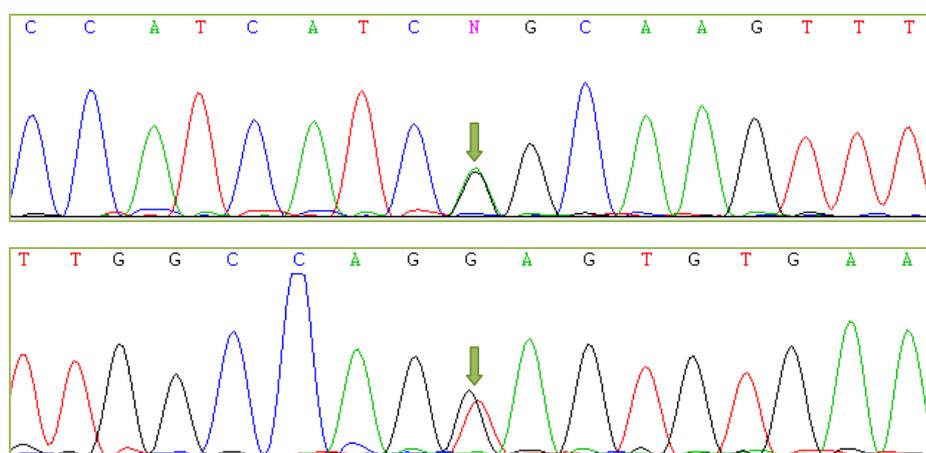


Figura 44. Secuenciación del exón 4 del gen *TGMI* del caso 24040 donde se detecta la variante c.625G>A (parte de arriba) y del exón 14 en el que se localiza la mutación c.2116G>T (parte de abajo).

Sería necesario realizar el estudio de los padres para comprobar si dichas mutaciones se sitúan en el mismo o en distintos alelos, pero no dispusimos de las muestras de ADN.

El estudio *in silico* de la variante p.G218S mostró los siguientes resultados (tabla 21):

Tabla 21. Estudio *in silico* de la mutación p.G218S.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-2,64

En este caso, todos los programas *in silico* de predicción valoraron a la variante p.G218S como no tolerada por la proteína; por lo tanto, capaz de inducir la expresión fenotípica de la enfermedad.

CASO 21041

Se trata de una niña nacida como bebé colodión. Presenta leve eritrodermia y descamación fina y blanquecina. No se observan ectropión, alopecia ni hiperqueratosis. Ha sido diagnosticada como bebé colodión autorresolutivo.

El análisis del gen *TGMI* mostró en este caso dos mutaciones en heterocigosis: la primera de ellas fue la **c.877-2A>G**, situada en el intrón 5 y la segunda la **c.1061C>T p.A354V**, localizada en el exón 7 (figura 45).

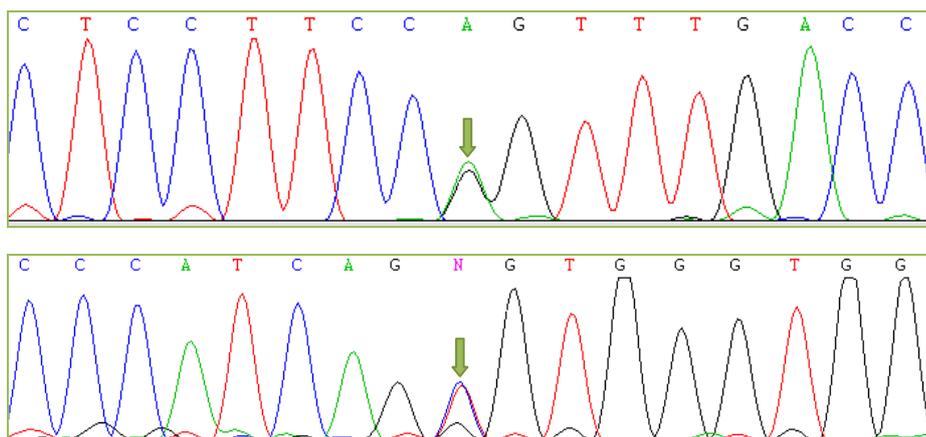


Figura 45. Secuenciación del exón 6 del gen *TGMI* del caso 24041 donde se detecta la variante c.877-2A>G (parte de arriba) y del exón 7 en el que se localiza la mutación c.1061C>T (parte de abajo).

La mutación c.877-2A>G, se localiza a tan sólo dos nucleótidos del exón 6, concretamente en la región crítica de procesamiento del intrón 5. Fue descrita por primera vez como variante patogénica en el año 1995 [45].

La segunda mutación detectada en la paciente 24041 fue la c.1061C>T p.A354V, localizada en heterocigosis en el exón 7 del gen *TGMI*, y que consiste en la sustitución del aminoácido alanina de la posición 354 por valina, concretamente situada en el dominio catalítico de la enzima. Esta variante nucleotídica no ha sido descrita hasta el momento en la literatura. Sería necesario realizar un amplio estudio poblacional y estudios funcionales para caracterizar su verdadero efecto en la función de la proteína.

Se realizó el estudio *in silico* para valorar teóricamente su posible efecto (tabla 22).

Tabla 22. Estudio *in silico* de la mutación p.A354V.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Posiblemente patogénica	0,8	Tolerada	1	Neutra	0,96

En el estudio *in silico* realizado el programa PolyPhen-2 consideró a la variante p.A354V como posiblemente patogénica frente a los programas SIFT y SNPs3D, que la valoraron como tolerada y neutra. Según el programa PolyPhen-2 posiblemente afectaría a la estructura de la proteína; por otro lado, no se trataría de un residuo conservado a lo largo de la evolución, dato que aporta el programa SIFT; ni conservado entre otras proteínas de familias relacionadas, información que determina el programa SNPs3D.

Al igual que en casos anteriores en los que se detectaban dos mutaciones en heterocigosis, sería conveniente realizar el estudio de las mutaciones encontradas, en los padres del caso índice, para comprobar la localización de las mismas y poder explicar la aparición del fenotipo en este caso. Tampoco dispusimos de estas muestras de ADN.

CASO 25459

Se trata de una niña diagnosticada de EIC, que presenta desde el nacimiento eritrodermia en toda la superficie corporal asociada a descamación importante, eclabión y ectropión.

El resultado del análisis del gen *TGMI* reveló la presencia de dos mutaciones en heterocigosis: la primera de ellas, la **c.424C>T p.R142C** localizada en el exón 3 y la segunda la **c.1472C>T p.T491M** situada en el exón 10 (figura 46).

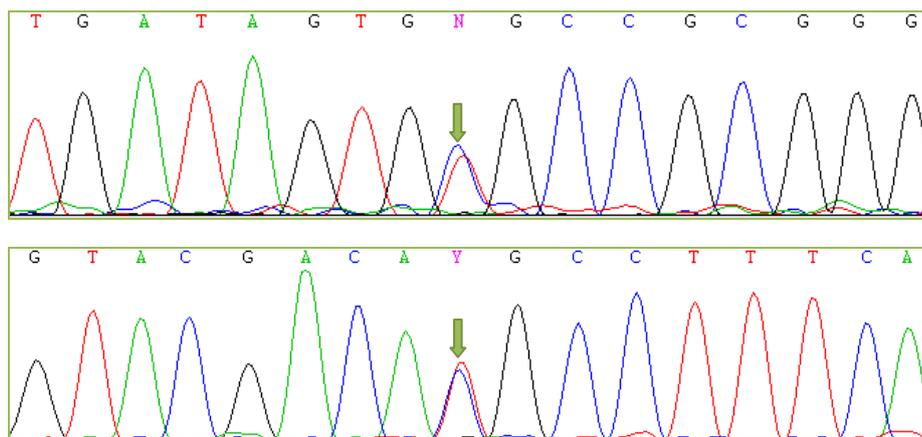


Figura 46. Secuenciación del exón 3 del gen *TGMI* del caso 25459 donde se detecta la variante c.424C>T (parte de arriba) y del exón 10 en el que se localiza la mutación c.1472C>T (parte de abajo).

La mutación p.R142C fue descrita por primera vez en el año 1995 [45]. Un trabajo publicado en el año 2010, en el que se realizó un estudio funcional *in vitro* de esta mutación, confirmó su naturaleza patogénica [234]. Además, en el año 2012 un segundo estudio funcional, esta vez realizado sobre un modelo animal, volvió a demostrar su patogenicidad [235].

La segunda mutación detectada en este caso (c.1472C>T p.T491M), también ha sido descrita anteriormente en la literatura, en un trabajo español del año 2011, donde fue calificada de variante patogénica [13]. Se sitúa en el exón 10 del gen y se detecta en heterocigosis; consiste en el cambio del aminoácido treonina de la posición 491 por metionina y se sitúa en el dominio catalítico de la proteína.

En este caso tampoco dispusimos de las muestras de ADN de los padres para comprobar si las mutaciones portadas por esta paciente se disponen en el mismo o en distintos cromosomas.

El estudio *in silico* de las variantes p.R142C y p.T491M mostró los siguientes resultados (tablas 23 y 24):

Tabla 23. Estudio *in silico* de la mutación p.R142C.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-4,55

Tabla 24. Estudio *in silico* de la mutación p.T491M.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Neutra	0,54

Todos los programas de predicción *in silico* consideraron a la mutación p.R142C como variante patogénica. En el caso de la segunda variante, la p.T491M, el programa SNPs3D la valoró como neutra frente a los otros dos programas utilizados.

CASO 26040

Se trata de una niña nacida como bebé colodión que cursa en la actualidad una ictiosis en traje de baño. No se dispuso de más datos clínicos.

En este caso el estudio del gen *TGMI* mostró la presencia de tres mutaciones en heterocigosis: la **c.449T>C p.L150P** situada en el exón 3, la **c.919C>G p.R307G** en el exón 6 y la **c.1571G>T p.G524V** en el exón 11 (figura 47).

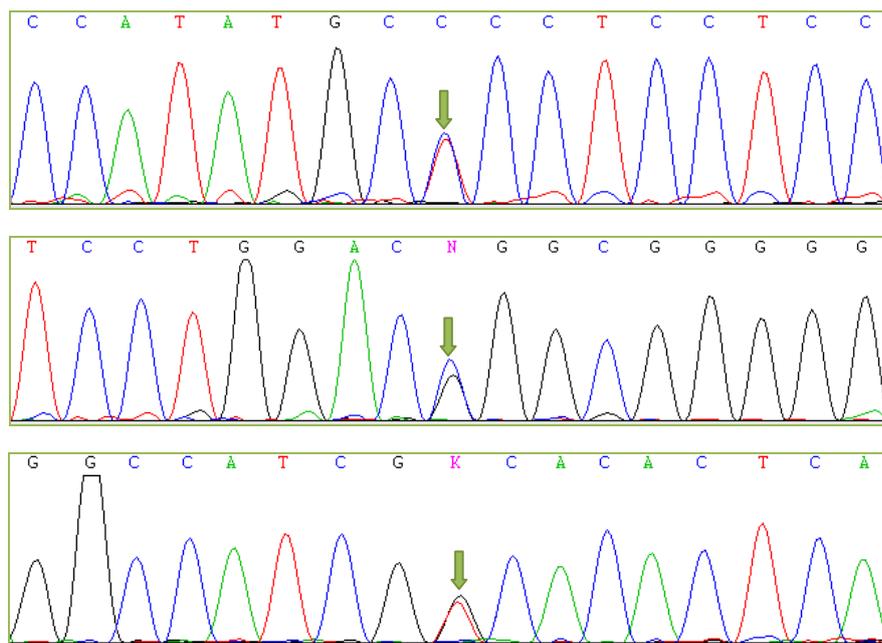


Figura 47. Secuenciación del exón 3 del gen *TGMI* del caso 26040 donde se detecta la variante c.449T>C (secuencia de arriba); del exón 6 donde se localiza la c.919C>G (secuencia central) y del exón 11 en el que se sitúa la c.1571G>T (secuencia de abajo), todas ellas en heterocigosis.

La mutación c.919C>G p.R307G, localizada en el exón 6 del gen, es la misma mutación patogénica que se detectó en el caso 19848. Las otras dos mutaciones se describen por primera vez en este trabajo doctoral.

El primer paso para intentar elucidar la naturaleza de estas dos nuevas variantes no descritas (p.L150P y p.G524V), consiste en el estudio de los padres de la paciente, para poder observar la procedencia de los alelos heredados por la misma y la posición de las mutaciones en ellos. Como se comentó en el caso 17596, ser portador de dos mutaciones en heterocigosis, siendo las ICAR enfermedades de baja prevalencia, es poco probable; de tal manera que si alguna de estas variantes sin describir, aparece junto con la mutación patogénica p.R307G, probablemente se trate de un polimorfismo, aunque siempre habría que confirmarlo con estudios poblacionales y funcionales, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El estudio genético de los padres mostró el siguiente resultado: la madre era la portadora de la mutación p.R307G y el padre portaba las otras dos variantes. Este resultado nos ha mostrado que las dos nuevas mutaciones se sitúan en el mismo alelo (figura 48), no pudiendo llegar a ninguna conclusión sobre la hipótesis planteada, ya que ninguna de las dos nuevas variantes aparece junto a la mutación patogénica p.R307G, en cuyo caso nos podría haber indicado que se trataba de un polimorfismo.

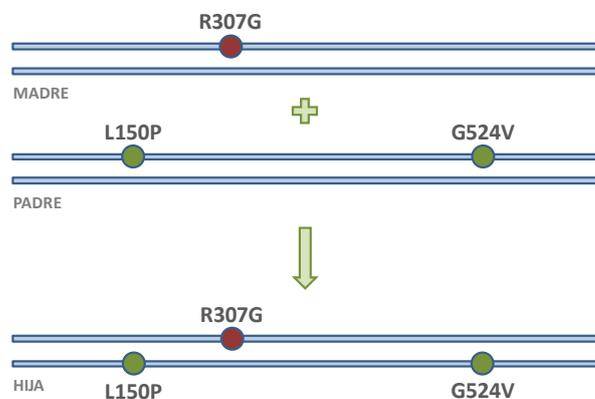


Figura 48. Representación esquemática de la disposición de las tres variantes nucleotídicas detectadas en la paciente 26040, comprobada a partir del estudio de las mismas en sus padres.

La variante p.L150P, se localiza en el exón 3 de gen *TGM1*, consiste en el cambio del aminoácido leucina de la posición 150 de la proteína por un residuo de prolina y se sitúa en el dominio sandwich- β de la enzima. Respecto a la variante p.G524V, consiste en la sustitución del aminoácido glicina de la posición 524 de la proteína por valina, región catalítica de la misma.

El estudio *in silico* de las variantes p.L150P y p.G524V mostró los siguientes resultados (tablas 25 y 26):

Tabla 25. Estudio *in silico* de la mutación p.L150P.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Benigna	0,002	Tolerada	1	Patogénica	-0,18

Tabla 26. Estudio *in silico* de la mutación p.G524V.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-4,64

En el estudio *in silico* de la variante c.449T>C p.L150P, los programas PolyPhen-2 y SIFT la consideraron como variante benigna y tolerada por la proteína, respectivamente, y el programa SNPs3D la valoró como variante patogénica. En el caso de la mutación c.1571G>T p.G524V, todos los programas de predicción la calificaron de variante patogénica.

Hasta que no se realicen los estudios poblacionales y funcionales de las variantes p.L150P y p.G524V, se deben de considerar de significado desconocido.

El estudio del gen *TGMI* reveló también la presencia de varios polimorfismos, tanto en heterocigosis como en homocigosis, que aparecen con una alta recurrencia en la población control, por lo tanto, no tienen ninguna implicación en la aparición del fenotipo de los pacientes (tabla 27).

Tabla 27. Polimorfismos detectados en el gen *TGMI*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
Región 5´ UTR	c.1-1200A>G	-
Exón 4	c.726G>A	p.E242E
Exón 7	c.1146C>A	p.G382G
Intrón 8	c.1298+9G>A	-
Intrón 8	c.1299-28C>G	-
Exón 11	c.1552G>A	p.V518M
Exón 14	c.2160C>T	p.T720T
Región 3´ UTR	g.*4T>C	-

c.: ADNc; p.: proteína; g.: genómico.

4.2 ANÁLISIS DEL GEN *ALOX12B*

El gen *ALOX12B* se sitúa en el cromosoma 17q13.1, tiene 15 exones y codifica la lipoxigenasa epidérmica 12R-LOX. Participa en la vía de degradación del ácido araquidónico, concretamente transformándolo en el ácido 12R-hidroxieicosatetraenoico. Se ha sugerido que el producto final de esta vía pueda tener un papel clave en la diferenciación de los queratinocitos, participando en el procesamiento de los cuerpos lamelares.

El análisis del gen *ALOX12B* en los pacientes con ICAR en los que no se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *TGMI* mostró los siguientes resultados (tabla 28).

Tabla 28. Variantes nucleotídicas detectadas en el gen *ALOX12B* y efecto de las mismas sobre la proteína.

Caso	Mutación	Cambio en la proteína
6413	c.397A>G (Exón 3) Homocigosis	p.R133G
17034	c.406_408delGAG (Exón 3) Homocigosis	p.136delE
17199	c.406_408delGAG (Exón 3) Heterocigosis	p.136delE
	c.1192C>T (Exón 9) Heterocigosis	p.H398Y
23100	c.1732C>T (Exón 13) Homocigosis	p.H578Y
23698	c.1562A>G (Exón 12) Heterocigosis	p.Y521C
	c.1790C>A (Exón 14) Heterocigosis	p.A597E
26179	c.1271_1272insC (Exón 9) Heterocigosis	p.Y424YfsX24
	c.1594G>A (Exón 12) Heterocigosis	p.E532K

c.: ADNc; p.: proteína.

CASO 6413

Se trata de un varón nacido como bebé colodión; en la niñez podía observarse eritrodermia y ectropión que han tenido una corrección espontánea. En la actualidad presenta descamación fina de color marrón. No cursa con hiperqueratosis palmoplantar ni alopecia.

El estudio del gen *ALOX12B* mostró la presencia de la mutación **c.397A>G** **p.R133G** en homocigosis, situada en el exón 3 del gen y que consiste en la sustitución del aminoácido arginina de la posición 133 de la proteína por un residuo de glicina (figura 49).

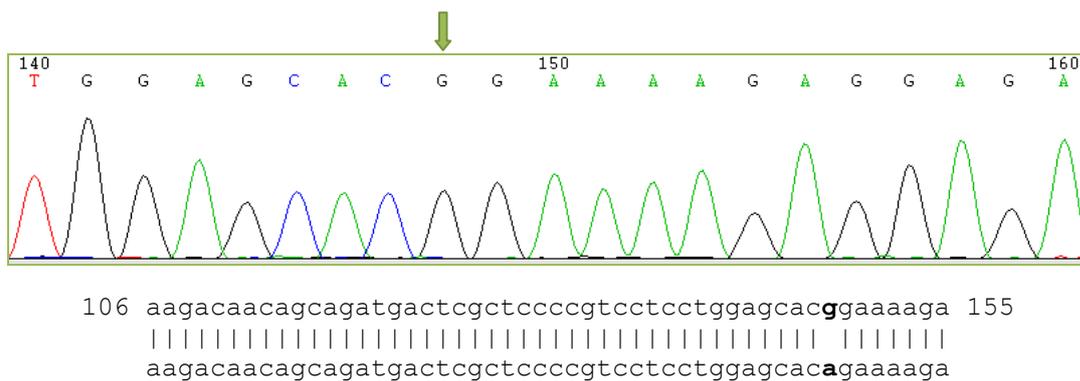


Figura 49. Secuenciación del exón 3 del gen *ALOX12B* del caso 6413 donde se detecta en homocigosis la mutación c.397A>G y su comparación con la secuencia consenso de referencia del gen.

Esta mutación no ha sido descrita anteriormente en la literatura, por lo tanto, hasta que no se realicen estudios funcionales y poblacionales de la misma se debe considerar como una variante de significado desconocido.

No se dispuso de más miembros de la familia para completar el estudio.

Para intentar elucidar teóricamente su efecto sobre la proteína se realizó el estudio *in silico* de la misma (tabla 29):

Tabla 29. Estudio *in silico* de la mutación p.R133G del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-1,81

Todos los programas *in silico* valoraron a la mutación p.R133G como variante patogénica; por lo tanto, no tolerada por la proteína.

También se realizó la comparación entre las secuencias de diferentes especies, para averiguar si la posición 133 de la proteína está conservada a lo largo de la evolución (figura 50).

<i>Homo sapiens</i>	127	PVLL HR KEEIRAKQDFYHWR	147	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	127	PILLE HR QEEIRAKQDFYHWR	147	95%
<i>Equus caballus</i>	127	PILLE HR QEEIRAKQDFYHWR	147	95%
<i>Macaca mulatta</i>	009	PVLL HR REEIRAKQDFYHWR	029	97%
<i>Mus musculus</i>	127	PILLE HR QEEIRAKKDFYHWR	147	92%
<i>Sus scrofa</i>	127	PILLE HR KEELRAKQDFYRWR	147	90%

Figura 50. Comparación del aminoácido arginina de la posición 133 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12-LOX en la especie humana)

CASO 17034

Se trata de una mujer nacida como bebé colodión. Ha sido diagnosticada de IL; presenta descamación tanto fina como gruesa y de color marrón, con eritrodermia y una discreta hiperqueratosis palmoplantar. No se observan en la paciente ni ectropión ni alopecia.

CASO 17199

Se trata de un niño con diagnóstico presuntivo de IL, del que no se dispuso de más datos clínicos.

El análisis del gen *ALOX12B* reveló en este caso la existencia de dos mutaciones en heterocigosis: la primera de ellas **c.406_408delGAG p.136delE** situada en el exón 3 y la segunda **c.1192C>T p.H398Y** localizada en el exón 9 (figura 52).

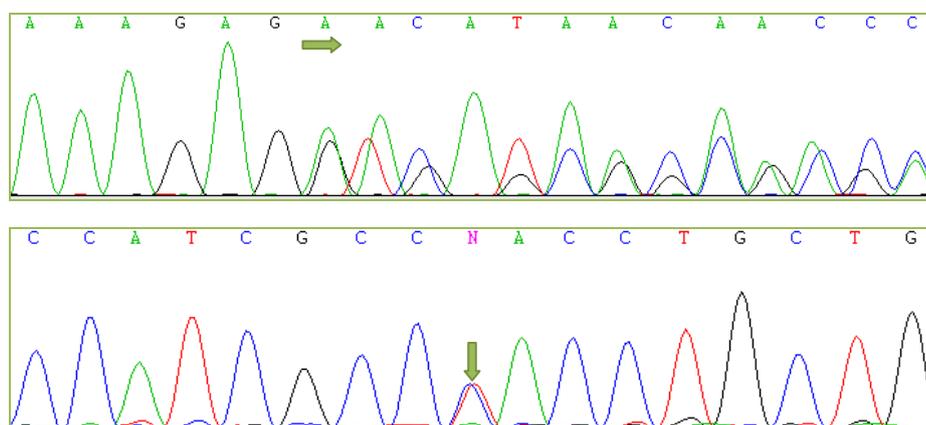


Figura 52. Secuenciación del exón 3 del gen *ALOX12B* del caso 17199 donde se detecta la variante c.406_408delGAG (parte de arriba) y del exón 9 en el que se localiza la mutación c.1192C>T (parte de abajo), ambas en heterocigosis.

Posteriormente se realizó el estudio de los exones 3 y 9 en los padres del probando. El padre del paciente era portador de la variante p.H398Y y la madre portaba la p.136delE, ambos en heterocigosis.

El estudio *in silico* mostró los siguientes resultados (tabla 30).

Tabla 30. Estudio *in silico* de la mutación p.H398Y del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-1,77

Todos los programas utilizados en el estudio *in silico* valoraron a la mutación p.H398Y como patogénica.

También se realizó un alineamiento de secuencias para comprobar si la posición 398 se trata de una región conservada a lo largo de la evolución (figura 53).

<i>Homo sapiens</i>	384	WVRYAEFYSHEAIA H LLETHL	404	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	382	WVRYAEFYCHEAIS H LLETHL	402	92%
<i>Equus caballus</i>	382	WVRYAEFYCHEAIS H LLETHL	402	92%
<i>Macaca mulatta</i>	039	WVRYAEFYSHEAIS H LLETHL	059	97%
<i>Mus musculus</i>	384	WVRYAEFYSHEAVA H LLESHL	404	95%
<i>Sus scrofa</i>	382	WVRYAEFYSHEAIS H LLETHL	402	97%

Figura 53. Comparación del aminoácido histidina de la posición 398 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12R-LOX en la especie humana)

CASO 23100

Se trata de un niño diagnosticado de IL que nació como bebé colodión. Presenta descamación fina y blanquecina sobre una leve eritrodermia e hiperqueratosis. No presenta ectropión, ni alopecia.

El estudio del gen *ALOX12B* mostró la presencia de la mutación **c.1732C>T** **p.H578Y** situada en el exón 13 del gen en homocigosis (figura 54).

<i>Homo sapiens</i>	568	TIVIIYTCSAK H AAVNTGQMEF	588	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	566	TIVIIYTCSAK H AAVNTGQLEY	586	93%
<i>Equus caballus</i>	566	TIVIIYTCSAK H AAVNTGQLEF	586	97%
<i>Macaca mulatta</i>	223	TIVIFTCSAK H AAVNTGQMEF	243	96%
<i>Mus musculus</i>	568	TMVMTCSAR H AAVN S GQLEY	588	81%
<i>Sus scrofa</i>	566	TIVIIYTC S AS H AAVNTGQLEF	586	92%
<i>Xenopus laevis</i>	537	TMVMFTCSAL H AAVN S GQFDF	557	72%

Figura 55. Comparación del aminoácido histidina de la posición 578 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12R-LOX en la especie humana)

Para intentar esclarecer teóricamente su efecto sobre la proteína se realizó el estudio *in silico* de la misma (tabla 31):

Tabla 31. Estudio *in silico* de la mutación p.H578Y del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-2,46

Todos los programas de predicción *in silico* valoraron a la mutación p.H578Y como patogénica.

CASO 23698

Se trata de una niña, de nacionalidad ucraniana, nacida como bebé colodión. Cursa con eritrodermia y descamación fina. No presenta ectropión, hiperqueratosis, ni alopecia. Su hermano (caso 23699) también es afecto, y presenta un fenotipo similar a excepción de que no presenta eritrodermia.

El análisis del gen *ALOX12B* reveló en este caso la existencia de dos mutaciones en heterocigosis: la primera de ellas situada en el exón 12, **c.1562A>G p.Y521C** y la segunda, situada en el exón 14 **c.1790C>A p.A597E** (figura 56).

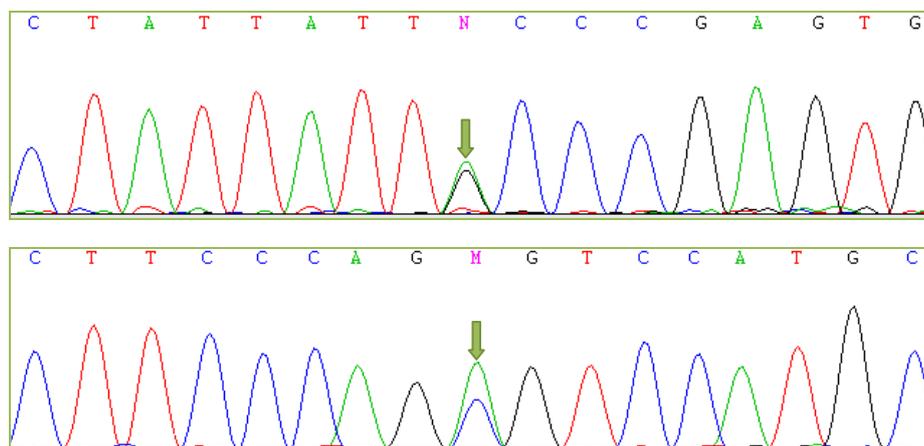


Figura 56. Secuenciación del exón 12 del gen *ALOX12B* del caso 23698 donde se detecta la variante c.1562A>C (parte de arriba) y del exón 14 en el que se localiza la mutación c.1790C>A (parte de abajo), ambas en heterocigosis.

En el hermano de la probando, caso 23699, se detectaron las dos mutaciones en el gen en heterocigosis. Se trata de nuevo de un caso con dos variantes nucleotídicas en heterocigosis. Al no disponer de las muestras de ADN de los padres no se pudo conocer la disposición de las mismas sobre los alelos heredados.

La c.1562A>G p.Y521C, se describió por primera vez en el año 2005 y consiste en el cambio del aminoácido tirosina de la posición 521 de la proteína por cisteína, región muy conservada de la proteína [209]. La c.1790C>A p.A597E, se identificó en el año 2010 y consiste en la sustitución del aminoácido alanina de la posición 587 de la proteína por ácido glutámico [33]. Aún así, se realizó el estudio *in silico* de las mismas (tablas 32 y 33).

Tabla 32. Estudio *in silico* de la mutación p.Y521C del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-3,13

Tabla 33. Estudio *in silico* de la mutación p.A597E del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Benigna	0,202	Tolerada	1	Patogénica	-0,30

En el caso de la mutación p.Y521C todos los programas *in silico* de predicción la valoraron como patogénica; por lo tanto, no tolerada por la proteína. La mutación p.A597E, fue considerada como variante neutra para la proteína a excepción del programa SNPs3D, que la valoró como patogénica.

En el alineamiento de secuencias se puede comprobar que la posición 521 de la proteína 12R-LOX se trata de un residuo conservado a lo largo de la evolución; sin embargo, la alanina de la posición 597 no se conserva en las diferentes especies comparadas (figuras 57 y 58).

<i>Homo sapiens</i>	511	KYVTEIITYYY Y PSDAAVEGDP	531	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	509	RYVTEIITYYY Y PCDAAVAGDP	529	87%
<i>Equus caballus</i>	509	RYVTEIITYYY Y PCDAAVEGDL	529	83%
<i>Macaca mulatta</i>	166	RYVTEIITYYY Y PSDAAVEGDP	186	97%
<i>Mus musculus</i>	511	RYVTEIITYYY Y PNDAAVEGDP	531	94%
<i>Sus scrofa</i>	509	RYVTEIITYYY Y PCDAAVEGDP	529	92%
<i>Xenopus laevis</i>	480	SYVSNIVHYY Y PNDQTVSKDP	500	56%

Figura 57. Comparación del aminoácido tirosina de la posición 521 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12R-LOX en la especie humana)

<i>Homo sapiens</i>	587	EFTAWMPNFPA	SMRNPPIQTK	607	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	585	EYTAWMPNFPS	SMRNPPMQAK	605	88%
<i>Equus caballus</i>	585	EFTAWMPNFPS	SMRNPPIRAK	605	89%
<i>Macaca mulatta</i>	242	EFTAWMPNFPA	SMRNPPIQAK	262	96%
<i>Mus musculus</i>	587	EYTSWMPNFPS	SMRNPPMQTK	607	89%
<i>Sus scrofa</i>	585	EFTAWMPNFPS	SMRNPPMQAK	605	91%
<i>Xenopus laevis</i>	556	DFYSWMPNGPS	TMRKPPPTAK	576	56%

Figura 58. Comparación del aminoácido alanina de la posición 597 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12R-LOX en la especie humana)

CASO 26179

Se trata de una niña nacida como bebé colodión con resolución espontánea de las lesiones. No se dispuso de más datos clínicos.

El análisis del gen *ALOX12B* reveló la existencia de dos mutaciones en heterocigosis: la primera de ellas situada en el exón 9, **c.1271_1272insC p.Y424YfsX24**, y la segunda situada en el exón 12 **c.1594G>A p.E532K** (figura 59).

De nuevo detectamos un caso con dos mutaciones en heterocigosis. La búsqueda de las mutaciones en los padres, ambos sanos, confirmó el patrón de herencia y explicó la aparición del fenotipo de la probando, ya que el padre es el portador de la mutación c.1271_1272insC y la madre la portadora de la mutación c.1594G>A, ambos en heterocigosis.

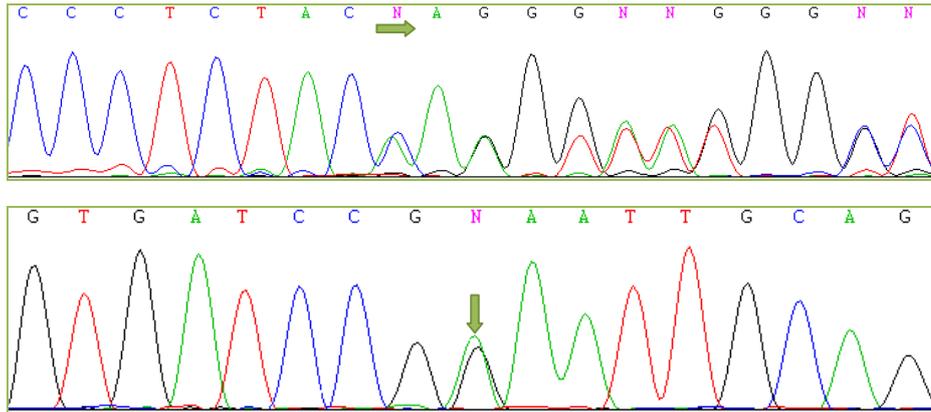


Figura 59. Secuenciación del exón 9 del gen *ALOX12B* del caso 26179 donde se detecta la mutación c.1271_1272insC (parte de arriba) y del exón 12 en el que se localiza la mutación c.1594G>A (parte de abajo), ambas en heterocigosis.

La mutación c.1271_1272insC ha sido descrita previamente en la literatura [76]. Consiste en la inserción de una citosina entre los nucleótidos 1271 y 1272 de la región codificante del gen *ALOX12B*, lo que provoca un cambio en la fase lectura y la aparición de un codón de parada prematuro 24 codones más adelante; por lo tanto, da lugar a una proteína truncada. Por su naturaleza es considerada patogénica.

La segunda mutación detectada en la paciente, c.1594G>A p.E532K, se describe por primera vez en este trabajo. Consiste en la sustitución del aminoácido ácido glutámico de la posición 532 de la proteína por un residuo de lisina.

Para intentar aclarar teóricamente si afecta o no a la función de la proteína se realizó el estudio *in silico* de la misma (tabla 34).

Tabla 34. Estudio *in silico* de la mutación p.E532K del gen *ALOX12B*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-2,10

Todos los programas de predicción *in silico* valoraron a la mutación p.E532K como patogénica.

Al igual que sucedía con otras variantes nucleotídicas detectadas por primera vez, hasta que no se realicen estudios funcionales y poblacionales de las mismas, se considerará a la variante c.1594G>A p.E532K de significado desconocido.

También se realizó un alineamiento de secuencias entre varias especies, para comprobar si la posición 532 de la proteína está conservada a lo largo de la evolución (figura 60).

<i>Homo sapiens</i>	517	ITYYYPSDAAVEGDPELQSWV	537	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	515	ITYYYPCDAAVAGDPELQSWV	535	90%
<i>Equus caballus</i>	515	ITYYYPCDAAVEGDLELQSWV	535	86%
<i>Macaca mulatta</i>	172	ITYYYPSDAAVEGDPELQSWV	192	100%
<i>Mus musculus</i>	517	ITYYYPNDAAVEGDPELQCWV	537	92%
<i>Sus scrofa</i>	515	ITYYYPCDAAVEGDPELQSWV	535	95%

Figura 60. Comparación del aminoácido ácido glutámico de la posición 532 de la proteína 12R-LOX entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con 12R-LOX en la especie humana)

El estudio del gen *ALOX12B* reveló también la presencia de varios polimorfismos (tabla 35). La mayoría se localizan en regiones intrónicas del gen, tanto en heterocigosis como en homocigosis y aparecen con una alta recurrencia en la población control, por lo tanto, no tienen ninguna implicación en la aparición del fenotipo de los pacientes.

Tabla 35. Polimorfismos detectados en el gen *ALOX12B*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
Intrón 2	c.353-57C>T	-
Exón 3	c.379C>T	p.P127S [211]
Intrón 4	c.527+45T>C	-
Intrón 5	c.650+7C>G	-
Intrón 10	c.1363-62G>C	-
Intrón 11	c.1532+30T>C	-
	c.1533-11C>G	-
Intrón 12	c.1654+94A>T	-
	c.1655-52G>T	-
	c.1655-30T>C	-

c.: ADNc; p.: proteína.

4.3 ANÁLISIS DEL GEN *ALOXE3*

El gen *ALOXE3* se sitúa en el cromosoma 17q13.1, tiene 15 exones y codifica la lipoxigenasa epidérmica eLOX-3. Interviene en la vía de degradación del ácido araquidónico, cuyo producto final se ha especulado que pueda participar en la formación de los lípidos intercelulares de la capa córnea o actuar como señal para promover la diferenciación de los queratinocitos.

El análisis del gen *ALOXE3* en los pacientes con ICAR en los que no se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *TGMI*, mostró únicamente una variante nucleotídica (tabla 36).

Tabla 36. Variante nucleotídica detectada en el gen *ALOXE3* y efecto de la misma sobre la proteína.

Caso	Mutación	Cambio en la proteína
2359	c.1889C>T (exón 14) Heterocigosis	p.P630L

c.: ADNc; p.: proteína.

CASO 2359

Se trata de un varón nacido de padres consanguíneos, que en la actualidad ha sido diagnosticado de IL. Presenta grandes escamas de color marrón e hiperqueratosis palmoplantar. Su hermana (caso 2375), nacida como BC, también es afecta, mostrando un fenotipo similar.

El análisis del gen *ALOXE3*, mostró la mutación **c.1889C>T p.P630L** situada en el exón 14 del gen en heterocigosis en ambos hermanos (figura 61).

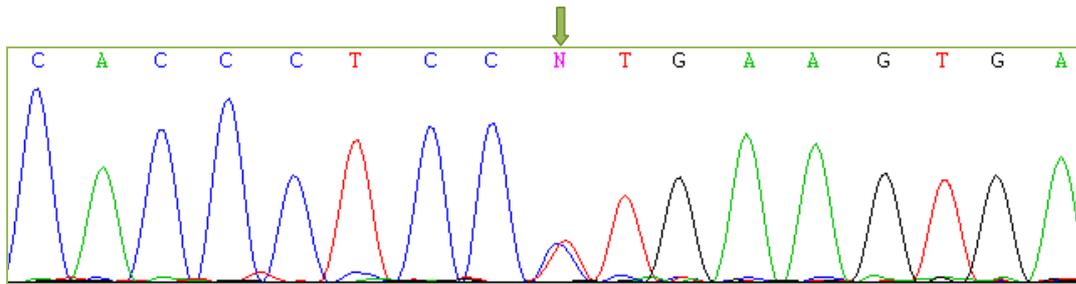


Figura 61. Secuenciación del exón 14 del gen *ALOXE3* del caso 2359 donde se detecta la mutación c.1889C>T en heterocigosis.

La mutación p.P630L, consiste en la sustitución del aminoácido prolina de la posición 630 de la proteína por leucina. El estudio *in silico* de la mutación mostró los siguientes resultados (tabla 37):

Tabla 37. Estudio *in silico* de la mutación p.P630L del gen *ALOXE3*.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-3,07

Todos los programas de predicción *in silico* valoraron a la mutación p.P630L como patogénica.

También se realizó un alineamiento de secuencias entre diferentes especies, para comprobar si la posición 630 de la proteína está conservada a lo largo de la evolución (figura 62).

<i>Homo sapiens</i>	620	TTLKTYLDTL P EVNISCNNLL	640	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	744	ATLKSYLDTL P EVNITCNNLL	764	89%
<i>Equus caballus</i>	759	TTLKSYLDTL P EVNITCKNLL	779	88%
<i>Mus musculus</i>	620	TTMKSYLDTL P EVNTTCRNNLL	640	81%
<i>Sus scrofa</i>	620	ATLKSYLDTL P EVNTTCNNTL	640	78%

Figura 62. Comparación del aminoácido prolina de la posición 630 de la proteína eLOX-3 entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con eLOX-3 en la especie humana)

No se detectó en este caso ninguna otra variante nucleotídica a lo largo del gen, ni patogénica ni de significado desconocido. No dispusimos de más miembros de la familia para completar el estudio.

El estudio del gen *ALOXE3* reveló también la presencia de varios polimorfismos (tabla 38). La mayoría se localizan en regiones intrónicas del gen, tanto en heterocigosis como en homocigosis y aparecen con una alta recurrencia en la población control, por lo tanto, no tienen ninguna implicación en la aparición del fenotipo de los pacientes.

Tabla 38. Polimorfismos detectados en el gen *ALOXE3*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
Intrón 1	c.148-78T>G	-
Intrón 2	c.353-61G>A	-
Intrón 5	c.555-65C>G	-
	c.555-38C>T	-
Intrón 6	c.681-14C>T	-
Intrón 7	c.785-22A>G	-
Intrón 10	c.1305+37C>G	-
Exón 11	c.1503G>C	p.L501L
Intrón 13	c.1684+17C>A	-
	c.1786-87C>T	-
Exón 15	c.2124C>T	p.S708S

c.: ADNc; p.: proteína.

4.4 ANÁLISIS DEL GEN *NIPAL4*

El gen *NIPAL4*, también conocido como *ICHTHYIN*, está localizado en el cromosoma 5q33. Tiene 6 exones que codifican una proteína con varios dominios transmembrana cuya función se desconoce, aunque se sugiere que está implicada en la formación de los cuerpos lamelares o en su transporte hacia el espacio extracelular.

El análisis del gen *NIPAL4* en los pacientes con ICAR en los que no se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *TGMI* mostró únicamente una mutación (tabla 39).

Tabla 39. Variante nucleotídica detectada en el gen *NIPAL4* y efecto de la misma sobre la proteína.

Caso	Mutación	Cambio en la proteína
17272	c.527C>A (exón 4) Homocigosis	p.A176D

c.: ADNc; p.: proteína.

CASO 17272

Se trata de una mujer diagnosticada de IL. No se dispuso de ningún otro dato clínico ni de más miembros de la familia.

El análisis del gen *NIPAL4* mostró en este caso la mutación homocigota **c.527C>A p.A176D** localizada en el exón 4 del gen que consiste en la sustitución del aminoácido alanina de la posición 176 de la proteína por ácido glutámico (figura 63).

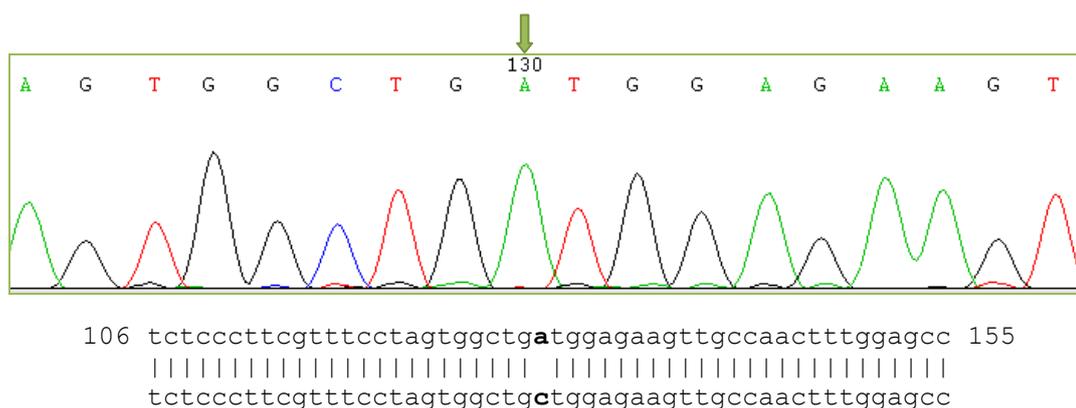


Figura 63. Secuenciación del exón 4 del gen *NIPAL4* del caso 17272 donde se detecta la variante c.527C>A en homocigosis (parte de arriba) y comparación de esta secuencia con la secuencia consenso de referencia del gen (parte de abajo).

El estudio *in silico* de la mutación p.A176D detectada en el gen *NIPAL4* mostró los siguientes resultados (tabla 40):

Tabla 40. Estudio *in silico* de la mutación p.A176D.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Posiblemente patogénica	0,78	No tolerada	1	Patogénica	-0,47

También se realizó un alineamiento entre las secuencias de distintas especies, para comprobar si la posición 176 de la proteína está conservada a lo largo de la evolución (figura 64).

<i>Homo sapiens</i>	166	MWWAGFLTMA A GEVANFGAYA	186	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	191	MWWAGFLTMA A GEVANFGAYA	211	100%
<i>Mus musculus</i>	106	MWWAGMATMS A GEVANFGAYA	126	87%
<i>Pan troglodytes</i>	169	MWWAGFLTMA A GEVANFGAYA	189	100%
<i>Xenopus laevis</i>	001	MWWAGLLTM G GEEANFAAYA	021	78%

Figura 64. Comparación del aminoácido alanina de la posición 176 de la proteína *NIPAL4* entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con *NIPAL4* en la especie humana)

El estudio del gen *NIPAL4*, también reveló la presencia de varios polimorfismos (tabla 41). La mayoría se localizan en regiones intrónicas del gen, tanto en heterocigosis como en homocigosis y aparecen con una alta recurrencia en la población control; por lo tanto, no tienen ninguna implicación en la aparición del fenotipo de los pacientes.

Tabla 41. Polimorfismos detectados en el gen *NIPAL4*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
Región 5' UTR	c.1-10A>G	-
Intrón 1	c.223+17T>G	-
	c.223+24C>G	-
	c.223+108G>A	-
Intrón 2	c.463+58C>T	-
Exón 5	c.637A>G	p.R213G
Intrón 5	c.772+49C>A	-
	c.772+61C>T	-
	c.772+74G>A	-
	c.772+142G>A	-
	c.773-50T>C	-
Exón 6	c.924C>A	p.G308G
	c.1302T>C	p.V434V
	c.1358C>T	p.S453L

c.: ADNc; p.: proteína.

4.5 ANÁLISIS DEL GEN *CYP4F22*

El gen *CYP4F22*, también llamado *FLJ39501*, se localiza en el cromosoma 19p13.12 y tiene 12 exones. Se ha sugerido que el citocromo P450 que codifica participe en la vía de las hepoxilinas y que el producto final de esta vía pueda tener un efecto biológico regulatorio clave en la piel.

Los resultados del estudio de este gen en aquellos pacientes en los que no se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *TGMI* se muestra es la siguiente tabla (tabla 42):

Tabla 42. Mutaciones detectadas en el gen *CYP4F22* y efecto de las mismas sobre la proteína.

Caso	Mutación	Cambio en la proteína
21275	c.728G>A (exón 6) Homocigosis	p.R243H
22223	c.1303C>T (exón 10) Homocigosis	p.H435Y
24027	c.1303C>T (exón 10) Homocigosis	p.H435Y

c.: ADNc; p.: proteína.

CASO 21275

Se trata de un niño nacido como bebé colodión, de padres consanguíneos, que posteriormente desarrolló una descamación blanquecina generalizada y eritrodermia leve. En la actualidad la afectación es fundamentalmente acral. No cursa ectropión, hiperqueratosis palmoplantar ni alopecia. Su hermana (caso 21276) también es afecta, pero con la diferencia de que no nació como bebé

colodión; presenta una fina descamación brillante sin eritema muy parecida a la de su hermano.

El análisis del gen *CYP4F22* mostró en este caso la presencia de la mutación homocigota **c.728G>A p.R243H**, situada en el exón 6 del gen. Esta mutación fue descrita por primera vez en la literatura en el año 2006 y fue considerada como variante patogénica [72].

La hermana (21276) presentó la misma mutación en homocigosis. Los padres, sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, portaban la mutación detectada en sus hijos en heterocigosis (figura 65).

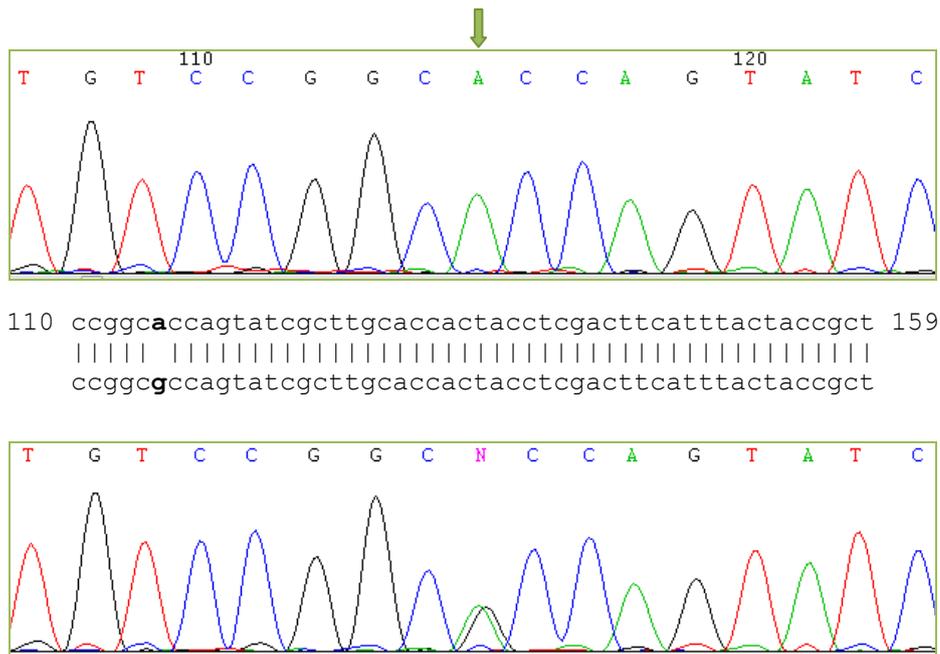


Figura 65. Secuenciación del exón 6 del gen *CYP4F22* del caso 21275 donde se detecta la variante c.728G>A en homocigosis (secuencia de arriba) y su comparación con la secuencia consenso de referencia del gen. En la secuencia de abajo puede observarse la misma mutación en heterocigosis portada por su madre.

La mutación p.R243H consiste en la sustitución del aminoácido arginina de la posición 243 de la proteína por histidina. Esta posición de la proteína está muy conservada en otras especies, lo que hace pensar que se trata de un residuo importante para la integridad de la función de la proteína (figura 66).

<i>Homo sapiens</i>	233	IIELSALSVR R QYRLHHYLDF	253	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	233	IIELSALVVR R QYRLHHHIDF	253	88%
<i>Macaca mulatta</i>	233	IIELSALAVR R QYRLHHYLDF	253	97%
<i>Xenopus laevis</i>	233	IYELSSLVVK R EHYLPHHDF	253	50%

Figura 66. Comparación del aminoácido arginina de la posición 243 de la proteína CYP4F22 entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con CYP4F22 en la especie humana)

El estudio *in silico* de la mutación p.R243H detectada en el gen *CYP4F22* mostró los siguientes resultados (tabla 43):

Tabla 43. Estudio *in silico* de la mutación p.R243H.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-1,98

Todos los programas de predicción *in silico* valoraron a la mutación p.R243H como patogénica.

Sería necesario realizar un estudio funcional de la mutación p.R243H del gen *CYP4F22* detectada en este paciente para poder confirmar la verdadera naturaleza de la misma.

El alineamiento de secuencias entre varias especies mostró que esta zona del gen se trata de una región conservada a lo largo de la evolución (figura 68).

<i>Homo sapiens</i>	425	IICLVSIYGT H HNPTVWPDSK	445	100%
<i>Canis lupus familiaris</i>	425	IICLVSIYGT H HNPTVWPDSK	445	100%
<i>Macaca mulatta</i>	425	IICLVSIYGT H HNPTVWPDSK	445	100%
<i>Xenopus laevis</i>	425	NSCLISYIYGT H HNPEVWPNPQ	445	69%

Figura 68. Comparación del aminoácido histidina de la posición 435 de la proteína CYP4F22 entre varias especies. (%: porcentaje de similitud con CYP4F22 en la especie humana)

Además se realizó el estudio *in silico* de la mutación p.H435Y con la intención de predecir teóricamente si su efecto es patogénico y en consecuencia, capaz de inducir la expresión fenotípica de la enfermedad (tabla 44):

Tabla 44. Estudio *in silico* de la mutación p.H435Y.

PolyPhen-2	Valor	SIFT	Valor	SNPs3D	Valor
Probablemente patogénica	1	No tolerada	1	Patogénica	-2,24

CASO 24027

Se trata de un varón con diagnóstico presuntivo de IL. No dispusimos de los datos clínicos del paciente, ni de ningún otro miembro de la familia.

Este caso porta la misma mutación patogénica en el gen *CYP4F22* que en el caso anterior: **c.1303C>T p.H435Y**, situada en el exón 10 en homocigosis.

El estudio del gen *CYP4F22* además reveló la presencia de varios polimorfismos (tabla 45). La mayoría se localizan en regiones intrónicas del gen, tanto en heterocigosis como en homocigosis y aparecen con una alta recurrencia en la población control, por lo tanto, no tienen ninguna implicación en la aparición del fenotipo de los pacientes.

Tabla 45. Polimorfismos detectados en el gen *CYP4F22*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
Exón 1	c.177C>T	p.F59F
	c.367+5G>A	-
Intrón 2	c.368-47C>A	-
	c.368-24C>T	-
Exón 5	c.582G>A	p.A194A
Intrón 5	c.671+62G>T	-
Intrón 6	c.940-79G>A	-
	c.1136+78C>T	-
Intrón 8	c.1136+115T>G	-

c.: ADNc; p.: proteína.

DISCUSIÓN



5. DISCVSIÓN

Las ictiosis congénitas autosómicas recesivas son trastornos infrecuentes de la queratinización que se engloban en las formas no sindrómicas de ictiosis. Actualmente se incluyen en este grupo la ictiosis arlequín, la ictiosis laminar, la eritrodermia ictiosiforme congénita, el bebé colodión autorresolutivo y la ictiosis en traje de baño [11].

Desde el punto de vista genético, las ICAR son muy heterogéneas. Hasta el momento se han descrito mutaciones patogénicas en 6 genes diferentes en el 78% de la población afecta: *TGM1* (32%), *NIPAL4* (16%), *ALOX12B* (12%), *CYP4F22* (8%), *ALOXE3* (5%) y *ABCA12* (5%) [75].

En nuestro estudio se incluyeron 29 pacientes procedentes de diversas áreas de la geografía española, excepto una de las familias que provenía de Ucrania. El 76% presentó alguna variante nucleotídica en los genes analizados: el 38% de ellos en el gen *TGM1*; el 21% en *ALOX12B*; el 3.5% en *ALOXE3*; el 3.5% en *NIPAL4*; y el 10% en *CYP4F22*. En el 24% de los pacientes restantes no se detectaron mutaciones; frecuencias similares a las descritas anteriormente en la literatura.

5.1 ESTVDIO DEL GEN *TGM1*

En nuestro trabajo hemos estudiado mediante PCR y secuenciación directa bidireccional, tanto las secuencias codificantes del gen *TGM1*, como sus regiones intrónicas adyacentes, detectando 17 variantes nucleotídicas:

- 11 mutaciones *missense* (65%): p.S42Y, p.R126C, p.R142C, p.L150P, p.G218S, p.R307G, p.A354V, p.T491M, p.E520G, p.G524V y p.Y544C.
- 2 mutaciones *nonsense* (11.5%): p.E706X y p.R814X.
- 2 mutaciones de *splicing* (11.5%): c.877-2A>G y c.984+1G>A.
- 1 delección (6%): c.1223_1227delACACA p.D408VfsX21.
- 1 mutación en la región promotora (6%): c.1-915_-916insC.

Las frecuencias de cada tipo de mutación se asemejan a las descritas hasta el momento en la literatura para este gen.

Para el análisis de estos resultados, hemos agrupado a los pacientes en tres grupos: homocigotos para una mutación, heterocigotos para una mutación y pacientes con dos mutaciones en heterocigosis.

CASOS CON UNA MUTACIÓN EN HOMOCIGOSIS

Tras el estudio de los pacientes incluidos en nuestro trabajo hemos caracterizado tres pacientes que presentaban mutaciones en el gen *TGMI* en homocigosis:

- **c.1631A>G p.Y544C, exón 11** (Caso 2371, IL)

La mutación p.Y544C fue descrita como patogénica en el año 2009 [56]; consideración a la que nos sumamos tras la realización del estudio filogenético, que mostró que la tirosina de la posición 544 de la proteína se conserva en diferentes especies. Además, el análisis *in silico* la catalogó de variante no tolerada por la proteína; y no fue detectada en ninguno de los controles analizados en el estudio poblacional realizado.

- **c.1223_1227delACACA p.D408VfsX21, exón 8** (Casos 2399 y 2527, IL)

Esta mutación ha sido descrita anteriormente en la literatura [55]. Por su naturaleza, es considerada patogénica ya que genera una proteína truncada que pierde parte de su dominio catalítico. En un estudio realizado en 2011 sobre población gallega, se detectó como mutación recurrente junto con las mutaciones c.984+1G>A y p.R760X, presentes en el 82% de las familias gallegas con mutaciones en *TGMI*, lo que sugirió un efecto fundador [13], que fue confirmado posteriormente por este mismo grupo mediante un análisis de haplotipos [16].

En nuestro estudio, detectamos esta mutación en dos de los casos analizados y también nos planteamos que el origen de la misma pudiera residir en un antecesor común a ambas familias, al tratarse de dos pacientes nacidos en áreas geográficas muy próximas; sin embargo, también podría tratarse de la misma mutación surgida en dos momentos diferentes y que es portada por las dos familias.

- **c.984+1G>A, intrón 6** (Caso 17596, EIC)

La mutación c.984+1G>A se describió inicialmente en el año 2009 [55] y en 2012 fue caracterizada como variante patogénica tras el estudio del ARNm de un paciente homocigoto para dicha alteración [236], que demostró que provoca la pérdida de la zona de procesamiento del intrón 6 y con ello se crean dos nuevos transcritos anómalos.

En este mismo paciente, detectamos una segunda mutación en homocigosis, la **c.1559A>G p.E520G**, localizada en el exón 11 de *TGMI* y descrita también como variante patogénica [232].

Al detectar a la mutación c.1559A>G p.E520G junto a otra mutación de naturaleza patogénica, como es la c.984+1G>A, también en homocigosis; y estar presente en heterocigosis en uno de los 50 individuos control incluidos en el análisis poblacional que realizamos, podría tratarse de un polimorfismo. Recientemente, varios autores también la han considerado como un polimorfismo poblacional, empleando los mismos criterios [13, 55]. Sin embargo, en el estudio *in silico*, los programas Polyphen-2 y SNPs3D, la valoraron como posiblemente patogénica y patogénica respectivamente; mientras que SIFT la consideró como variante tolerada por la proteína.

La naturaleza de las tres mutaciones detectadas, c.1631A>G p.Y544C, c.1223_1227delACACA p.D408VfsX21 y c.984+1G>A; y su estado en homocigosis, son suficientes para explicar la herencia autosómica recesiva de la enfermedad y la aparición del fenotipo en estos pacientes.

CASOS CON UNA MUTACIÓN EN HETEROCIGOSIS

El estudio del gen *TGMI* en nuestra serie de pacientes mostró tres casos que presentaban una única mutación en heterocigosis:

- **c.2440C>T p.R814X, exón 15** (Caso 20503, IL)

La variante c.2440C>T p.R814X, está situada a tan sólo 4 codones del codón de parada de la proteína y no ha sido descrita previamente en la literatura.

Normalmente, las mutaciones *nonsense* se consideran patogénicas, por interrumpir el marco de lectura y dar lugar a productos truncados; sin embargo, dada su proximidad al codón de parada normal de la proteína, no podemos

categorizarla como tal sin la realización de estudios funcionales. Por ello, se consideró como una variante de significado desconocido; destacando que si se demuestra su patogenicidad, se trataría de la mutación más cercana al extremo 3´ identificada hasta el momento en el gen *TGMI*.

- **c.1-915_-916insC, región 5´UTR** (Caso 21189, IL)

Esta variante no está descrita hasta el momento en la literatura; por lo tanto, sería necesario realizar estudios poblacionales y un estudio funcional *in vitro*, para comprobar si provoca alteraciones en los niveles de expresión del gen o por el contrario, que se trate de un polimorfismo poblacional. Por ello, se consideró de significado desconocido y se prosiguió con el estudio del resto de genes.

- **c.125C>A p.S42Y, exón 2** (Caso 22223, BCA)

Esta mutación fue descrita como patogénica en el año 1995 [45], pero sin la realización de ningún tipo de estudio funcional ni poblacional que pudiera corroborar su naturaleza. De hecho, en un trabajo posterior, realizado en células transfectadas con el ADNc portador de la mutación, se observó que la enzima *tgm1* resultante presentaba una actividad enzimática similar a la de la proteína nativa [237]. Por ello proseguimos con el estudio del resto de genes.

El estudio de *TGMI* en este grupo de pacientes, no mostró ningún otro cambio nucleotídico, ni patogénico ni de significado desconocido, a lo largo del gen. La presencia de una mutación en heterocigosis no sería suficiente para explicar el fenotipo en estos casos, ya que la herencia de las ICAR es autosómica recesiva.

Otro dato, es el hecho de que pueda existir en estos casos otro tipo de mutación, como un gran reordenamiento, que no puede ser detectado con las técnicas utilizadas en este trabajo.

Al no conocer la verdadera naturaleza de las variantes c.2440C>T p.R814X y c.1-915_-916insC, que describimos por primera vez, en estos pacientes heterocigotos para una mutación, se prosiguió con el estudio del resto de genes seleccionados.

CASOS CON DOS MUTACIONES EN HETEROCIGOSIS

De todos los pacientes analizados 5 eran heterocigotos compuestos. El efecto de la combinación de dos mutaciones distintas en heterocigosis en el mismo individuo ha sido descrito en numerosas ocasiones en pacientes diagnosticados de ICAR, sugiriéndose que dos mutaciones heterocigotas, una en cada alelo, podrían tener el mismo efecto biológico que una en homocigosis [49, 238, 239].

- **c.376C>T p.R126C, exón 3 y c.919C>G p.R307G, exón 6** (Caso 19848, BCA)

Ambas mutaciones fueron descritas inicialmente en el año 2006 en pacientes afectados de ITB [43], y en 2009 fueron caracterizadas a nivel funcional y consideradas como variantes patogénicas [233]. En dicho estudio funcional se observó una reducción de la temperatura óptima para la actividad de la enzima portadora de estos dos cambios, de 37 a 31°C; así como se demostró la disminución de la actividad enzimática en un 13%. En relación a estos datos, se ha sugerido que la temperatura de la piel podría desempeñar un papel en el desarrollo de este fenotipo.

Se ha demostrado mediante termografía digital una fuerte correlación entre la temperatura corporal y la presencia de descamación, siendo las zonas más calientes del cuerpo las más afectadas [43].

En nuestro estudio, las mutaciones c.376C>T p.R126C y c.919C>G p.R307G detectadas en este caso se encontraron en alelos diferentes; como comprobamos a partir del análisis de sus progenitores, lo cual confirma el patrón de herencia autosómica recesivo de la enfermedad.

El caso 19848, portador de estas dos mutaciones, está diagnosticado de BCA y no de ITB, fenotipo con el que se han asociado estas mutaciones hasta el momento.

- **c.625G>A p.G218S, exón 4 y c.2116G>T p.E706X, exón 14** (Caso 24040, IL)

La mutación c.625G>A p.G218S fue descrita como variante patogénica en el año 1997, a partir de un estudio *in silico* que sugirió que, al situarse en una cadena principal, daría lugar a una proteína mal plegada, lo cual afectaría a la estabilidad de la misma [49]. Además se descartó que se tratara de un polimorfismo poblacional mediante su estudio en 400 individuos control.

La mutación c.2116G>T p.E706X, se describe por primera vez en este trabajo. Dicho cambio da lugar a una proteína truncada, que pierde parte de su dominio barril β 2, por lo que se consideraría patogénica.

Este hallazgo de la mutación *nonsense* p.E706X, resulta de gran interés ya que las mutaciones en el dominio C-terminal de *TGM1* no son muy frecuentes; en la mayoría de los casos se presentan con una segunda mutación que se localiza en

el dominio catalítico de la enzima [48, 57, 58, 240, 241] y muestran un fenotipo de EIC o de IL leve; por ello se ha planteado que las mutaciones en el dominio C-terminal, podrían dar lugar a fenotipos menos severos clínicamente que otras mutaciones en el gen. Sin embargo, se ha descrito la mutación p.R760X en homocigosis en un individuo con un fenotipo de EIC muy grave, por lo tanto, esta correlación con la gravedad de la ictiosis está todavía por confirmar. Todos estos hallazgos reafirman la importancia de la integridad de los dominios barril $\beta 1$ y $\beta 2$ para el correcto funcionamiento de la enzima, contrario a lo que se pensó inicialmente [242, 243].

- **c.877-2A>G, intrón 5 y c.1061C>T p.A354V, exón 7** (Caso 24041, BCA)

La mutación c.877-2A>G, fue descrita en 1995 como variante patogénica [45] y en estudios posteriores se confirmó su naturaleza [12, 241]. Esta mutación es la más frecuente en el gen *TGMI*, ya que ha sido encontrada en el 34% de los alelos mutados descritos hasta la fecha [55].

Por otro lado, la mutación c.1061C>T p.A354V, localizada en el dominio catalítico de la enzima, no ha sido descrita hasta el momento en la literatura; sería necesario realizar un amplio estudio poblacional y estudios funcionales para caracterizar su verdadero efecto en la función de la proteína. Sin olvidar la necesidad de confirmar el patrón de herencia de ambas mutaciones en este individuo.

- **c.424C>T p.R142C, exón 3 y c.1472C>T p.T491M, exón 10** (Caso 25459, EIC)

La mutación p.R142C descrita inicialmente en el año 1995 [45], fue caracterizada a nivel funcional en varios trabajos posteriores que demostraron su efecto reduciendo la estabilidad de la enzima y anulando prácticamente su actividad tanto *in vitro* [234], como *in vivo* [235]. El ratón *knock-in* homocigoto para esta mutación del estudio *in vivo* se caracterizaba por presentar una actividad enzimática de tgml muy baja o prácticamente nula. A nivel fenotípico estos ratones mostraban graves defectos morfológicos en la piel al nacer y una gran similitud con la membrana colodión de los pacientes con ICAR; así como una alta mortalidad neonatal. Este no es el primer modelo animal en el que se demuestra la implicación de *TGMI* en el desarrollo de las ICAR. En 1998 la construcción de un ratón *knock-out* para el gen mostró un fenotipo de ICAR y confirmó la importancia de la integridad del mismo en la correcta formación de la piel [244].

Además, en esta misma posición de la proteína, se han identificado las mutaciones p.R142H [233, 245] y p.R142P [246]; por lo que se trataría de una región del gen propensa a mutar [49]. Siendo la mutación p.R142H, la segunda más frecuente detectada en *TGMI*.

La mutación c.1472C>T p.T491M, también ha sido descrita en la literatura, en un trabajo español de 2011, en el que fue considerada patogénica [13]. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios poblacionales ni funcionales que confirmen este resultado. En el estudio *in silico* que realizamos los programas PolyPhen-2 y SIFT la etiquetaron como patogénica, mientras que el programa SNPs3D, la clasificó como variante neutra.

- **c.449T>C p.L150P, exón 3; c.919C>G p.R307G, exón 6 y c.1571G>T p.G524V, exón 11** (Caso 26040, ITB)

La mutación p.R307G se caracteriza por ser de naturaleza patogénica, como se ha descrito previamente en esta discusión en relación al caso 19848 (BCA) en el que también se detectó.

Por otro lado, las variantes p.L150P y p.G524V se describen por primera vez en nuestro trabajo. Ambas aparecen situadas en el mismo alelo y esto hace pensar que probablemente una de ellas pueda tratarse de un polimorfismo.

En el estudio *in silico* de la variante c.449T>C p.L150P, los programas PolyPhen-2 y SIFT la consideraron como variante benigna y tolerada por la proteína, respectivamente; y el programa SNPs3D la valoró como variante patogénica. En el caso de la mutación c.1571G>T p.G524V, todos los programas de predicción la calificaron de variante patogénica. Además, destaca el hecho de que en el codón 524 de *TGMI* han sido descritas recientemente otras mutaciones patogénicas, p.G524D y p.G524S [247], lo cual podría indicar que esta región del gen se trata de una zona propensa a mutar.

Las variantes p.G524D y p.G524S, se publicaron en el año 2012 y fueron detectadas en heterocigosis junto a una segunda mutación patogénica en pacientes nacidos como bebé colodión y que evolucionaron a una ITB, fenotipo que también cursa el caso 26040.

Respecto al grupo de pacientes heterocigotos compuestos, se considera que la presencia de dos mutaciones patogénicas en heterocigosis sería suficiente para explicar la herencia autosómica recesiva y la aparición de la enfermedad, siempre que se pueda verificar su localización en los alelos del gen mediante el estudio de los progenitores; como en los casos 19848 y 26040. Del mismo modo, es necesario realizar análisis complementarios que determinen la naturaleza de las nuevas mutaciones detectadas: c.449T>C p.L150P, c.1061C>T p.A354V, c.1571G>T p.G524V y c.2116G>T p.E706X.

Por último, a modo de síntesis se resumen todos los resultados obtenidos y discutidos en el análisis del gen *TGMI* (tabla 46):

Tabla 46. Resumen de las mutaciones detectadas en el gen *TGMI*.

Caso	Diagnóstico	Mutación	Descrita
2371	IL	c.1631A>G p.Y544C Homocigosis	Sí
2399	IL	c.1223_1227del5 p.D408VfsX21 Homocigosis	Sí
2527	IL	c.1223_1227del5 p.D408VfsX21 Homocigosis	Sí
17596	EIC	c.984+1G>A Homocigosis	Sí
		c.1559A>G p.E520G Homocigosis	Sí
19848	BCA	c.376C>T p.R126C Heterocigosis	Sí
		c.919C>G p.R307G Heterocigosis	Sí
20503	IL	c.2440C>T p.R814X Heterocigosis	No
21189	IL	c.1-915_-916insC (5'UTR) Heterocigosis	No
22223	BCA	c.125C>A p.S42Y Heterocigosis	Sí
24040	IL	c.625G>A p.G218S Heterocigosis	Sí
		c.2116G>T p.E706X Heterocigosis	No
24041	BCA	c.877-2A>G Heterocigosis	Sí
		c.1061C>T p.A354V Heterocigosis	No
25459	EIC	c.424C>T p.R142C Heterocigosis	Sí
		c.1472C>T p.T491M Heterocigosis	Sí
		c.449T>C p.L150P Heterocigosis	No
26040	ITB	c.919C>G p.R307G Heterocigosis	Sí
		c.1571G>T p.G524V Heterocigosis	No

5.2 ESTUDIO DEL GEN *ALOX12B*

En nuestro estudio hemos identificado variantes nucleotídicas en el gen *ALOX12B* en 6 de los pacientes analizados:

- 6 mutaciones *missense* (75%): p.R133G, p.H398Y, p.Y521C, p.E532K, p.H578Y y p.A597E.
- 1 delección (12.5%): c.406_408delGAG p.136delE.
- 1 inserción (12.5%): c.1271_1272insC p.Y424YfsX24.

Tres de ellos fueron homocigotos para una mutación y los otros tres fueron heterocigotos compuestos.

CASOS CON UNA MUTACIÓN EN HOMOCIGOSIS

- **c.397A>G p.R133G, exón 3** (Caso 6413, EIC)

En este trabajo se describe por primera vez la mutación c.397A>G p.R133G, planteando su posible naturaleza patogénica a raíz de los resultados obtenidos en el estudio *in silico* realizado; en el cual, todos los programas informáticos la catalogaron como variante patogénica. Además, el alineamiento de secuencias entre varias especies mostró que el residuo 133 de la proteína 12R-LOX se trata de un aminoácido conservado a lo largo de la evolución. No obstante, serían necesarios estudios funcionales que confirmaran estos datos.

- **c.406_408delGAG p.136delE, exón 3** (Caso 17034, IL)

Esta variante no ha sido descrita anteriormente en la literatura asociada a la aparición de ICAR; sin embargo, la hemos encontrado en la base de datos

COSMIC, que agrupa mutaciones somáticas asociadas a cáncer. En este catálogo de mutaciones se especifica que fue detectada en el ADN de una biopsia de carcinoma de estómago en heterocigosis. No aporta ningún otro dato, ni referencia bibliográfica científica donde podamos corroborar en qué estudio se identificó; lo cual sería útil dado que el paciente en el que se detectó podría tratarse de un portador de ICAR asintomático.

- **c.1732C>T p.H578Y, exón 13** (Caso 23100, IL)

Esta mutación, tampoco está descrita en la literatura; pero el hecho de que en la misma posición se haya detectado otra mutación patogénica (p.H578Q) [208], nos podría indicar que esta región del gen se trata de una zona propensa a mutar. Además, el estudio comparativo del aminoácido histidina de la posición 578 de la proteína entre varias especies muestra que se trata de un residuo conservado a lo largo de la evolución.

Por otro lado, todos los programas utilizados en el estudio *in silico* la valoraron como probablemente patogénica. Cabe destacar, que el análisis de los padres confirmó el patrón de herencia, ya que ambos resultaron heterocigotos para la alteración.

La presencia de una mutación patogénica en homocigosis en el gen *ALOX12B* sería suficiente para explicar la aparición de la enfermedad; pero al tratarse de variantes sin describir anteriormente en la literatura (p.R133G, p.136delE y p.H578Y), hasta que no se confirme el efecto que desencadenan en la función de la proteína 12R-LOX deben considerarse de significado desconocido.

CASOS CON DOS MUTACIONES EN HETEROCIGOSIS

- **c.406_408delGAG p.136delE, exón 3 y c.1192C>T p.H398Y, exón 9**

(Caso 17199, IL)

La variante c.406_408delGAG, ya ha sido descrita en esta discusión en el caso 17034, y es considerada de significado desconocido.

La segunda mutación, c.1192C>T p.H398Y, aparece descrita como un polimorfismo (rs140063508), aunque su frecuencia es muy baja (1 por cada 4545 alelos analizados). De cualquier forma, hasta que no se confirme funcionalmente el efecto de este cambio nucleotídico sobre la proteína, se considerará de significado desconocido, teniendo en cuenta que el individuo en el que se detectó puede tratarse de un portador sin enfermedad.

- **c.1562A>G p.Y521C, exón 12 y c.1790C>A p.A597E, exón 14** (Caso

23698, EIC)

La mutación c.1562A>G p.Y521C, fue descrita por primera vez en el año 2005 [209] y en 2009 fue caracterizada a nivel funcional [76]. En este último trabajo, se midió la actividad catalítica de la enzima que contenía esta mutación frente a la proteína nativa, demostrando que la presencia de la mutación c.1562A>G en el gen, hace perder la función a la proteína.

La mutación c.1790C>A p.A597E, fue descrita como variante patogénica en el año 2010, en un trabajo que incluía 15 probandos nacidos como bebé colodiño y que habían seguido un curso autorresolutivo (BCA), en el que se realizó un estudio poblacional de la misma en 140 individuos control, sin que fuera detectada en ninguno de ellos [33].

El estudio *in silico* realizado de esta mutación la valoró como variante tolerada por la proteína en el caso de los programas PolyPhen-2 y SIFT, y como patogénica por el programa SNPs3D. El alineamiento de secuencias entre diferentes especies realizado, mostró que el aminoácido alanina de la posición 597 de la proteína, no se conserva a lo largo de la evolución.

Por último, mencionar que el hermano de esta paciente, también afecto, es portador de estas dos mutaciones patogénicas en heterocigosis.

- **c.1271_1272insC p.Y424YfsX24, exón 9 y c.1594G>A p.E532K, exón 12** (Caso 26179, BCA)

La mutación c.1271_1272insC ha sido descrita y considerada patogénica previamente en la literatura [76].

La mutación c.1594G>A p.E532K, se describe por primera vez en este trabajo. Destacando que el estudio *in silico* realizado la valoró como variante patogénica en los tres programas utilizados y que el alineamiento de secuencias entre distintas especies mostró que el aminoácido ácido glutámico de la posición 532 de la proteína se trata de un residuo conservado a lo largo de la evolución.

Sería conveniente realizar un estudio funcional de la variante c.1594G>A p.E532K. Si este estudio confirmara que se trata de una variante patogénica, su presencia en heterocigosis, junto con la c.1271_1272insC sería suficiente para poder explicar la aparición de la enfermedad en este caso.

El análisis de los padres confirmó el patrón de herencia, ya que cada uno de ellos era el portador de una de las mutaciones detectadas en la hija.

5.3 ESTUDIO DEL GEN *ALOXE3*

El estudio del gen *ALOXE3*, se detectó un paciente portador de mutación; el caso 2359 (IL), en el que aparecía en heterocigosis la mutación **c.1889C>T p.P630L**, situada en el exón 14 del gen. No se detectó en este caso ninguna otra alteración nucleotídica a lo largo del gen.

Esta mutación, fue descrita por primera vez en el año 2005, en un trabajo en el que se caracterizó como variante patogénica mediante en un ensayo *in vitro* de la medida de la actividad de la proteína eLOX-3 que portaba este cambio nucleotídico [209]. Posteriormente ha sido detectada en numerosos pacientes con ICAR, se trata de una de las dos mutaciones identificadas de forma recurrente en este gen [76].

El estudio *in silico* realizado la valoró como variante patogénica y el alineamiento de secuencias entre varias especies mostró que se situaba en una región de la proteína conservada a lo largo de la evolución. Pese a esto, la presencia de una única mutación en heterocigosis, no sería suficiente para poder explicar la aparición del fenotipo en este caso.

Nos planteamos el hecho de que en este paciente, pueda existir algún otro tipo de mutación no detectable mediante secuenciación directa, como por ejemplo, un gran reordenamiento detectable mediante la técnica de MLPA o que coexista mutación en otro gen no incluido en nuestro estudio.

En la hermana del paciente, también afecta, se identificó la misma mutación en heterocigosis; no ha sido posible estudiar a más miembros de la familia.

5.4 ESTUDIO DEL GEN *NIPAL4*

En nuestro estudio únicamente encontramos mutación en el gen *NIPAL4* en uno de los pacientes, el caso 17272 (IL). El análisis mostró la mutación homocigota **c.527C>A p.A176D** localizada en el exón 4, la cual se describió por primera vez en la literatura en el año 2004 en un trabajo que incluía 14 familias originarias de países del Mediterráneo [218].

Posteriormente, en el año 2007 se describió en pacientes originarios de países nórdicos [219] y en 2010, también fue identificada en un trabajo en el que se analizó este gen en dos familias de origen paquistaní afectas de EIC [220].

La mutación p.A176D es la más recurrente en pacientes con mutaciones en *NIPAL4*. Además el hecho de que aparezca en distintas poblaciones, puede sugerir que este punto del gen contenga un sitio caliente de mutaciones, considerando además que en esta misma posición se ha detectado otra variante patogénica, la p.A176N [221].

La presencia de la mutación homocigota c.527C>A p.A176D del gen *NIPAL4* identificada en esta paciente sería suficiente para poder explicar la aparición del fenotipo.

5.5 ESTUDIO DEL GEN *CYP4F22*

En nuestro trabajo, 3 de los pacientes analizados presentaron mutaciones en el gen *CYP4F22*, todos ellos fueron homocigotos para una mutación:

- **c.728G>A p.R243H, exón 6** (Caso 21275, BCA acral)

Esta mutación se detectó por primera vez en el año 2006 en un paciente argelino y fue considerada patogénica al estar situada en un residuo conservado del gen y no haberla detectado en una población control de 100 individuos [72].

En nuestro estudio, todos los programas utilizados en el análisis *in silico*, la consideraron patogénica.

La hermana de este paciente, que presentaba un fenotipo parecido resultó ser también homocigota para la variante. Por otro lado, el estudio de los padres nos permitió confirmar el patrón de herencia autosómico recesivo de la enfermedad.

Cabe mencionar que este caso (21275), fue remitido al laboratorio con sospecha de una ictiosis de afectación acral. Hasta la fecha, en los pacientes con este tipo fenotípico característico de distribución de las escamas, se han identificado mutaciones en el gen *TGMI* [35]. Sería conveniente, llevar a cabo un seguimiento de estos dos hermanos con ICAR, para observar su evolución fenotípica a lo largo del tiempo y poder comprobar si verdaderamente cursan una ICAR de distribución acral; si esto se confirma estaríamos ante en primer caso de este tipo de ictiosis causada por una mutación en el gen *CYP4F22*.

- **c.1303C>T p.H435Y, exón 10** (Caso 22223, BCA; y Caso 24027, IL)

Esta mutación fue descrita por primera vez en el año 2006 y fue considerada patogénica al estar situada en una región conservada del gen y al no haberla encontrado en un estudio poblacional realizado en 100 individuos control. Se trata de la mutación más recurrente detectada en *CYP4F22*. Ha sido identificada previamente en pacientes de origen argelino, francés e italiano [72].

El estudio *in silico* de la mutación c.1303C>T p.H435Y realizado la valoró como mutación patogénica. El alineamiento de secuencias entre varias especies mostró que el aminoácido 435 de la proteína *CYP4F22* se trata de un residuo conservado a lo largo de la evolución.

En el caso 22223, diagnosticado de BCA, previamente habíamos detectado la variante p.S42Y en heterocigosis en el gen *TGMI*. El hecho de haber detectado una mutación patogénica en homocigosis en el gen *CYP4F22*, apoya la sospecha de que la variante encontrada en *TGMI* se trate de un polimorfismo.

Dado que las dos mutaciones en el gen *CYP4F22* detectadas en nuestro estudio, c.728G>A p.R243H y c.1303C>T p.H435Y, se presentan en homocigosis y que ambas están descritas previamente en la literatura como variantes patogénicas, podemos concluir que son datos suficientes para poder explicar la aparición del fenotipo en estos casos.

Por último, a modo de síntesis se resumen todos los resultados obtenidos y discutidos en el análisis de los genes *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22* en los 29 probandos con ICAR incluidos en este trabajo doctoral (tabla 47):

Tabla 47. Resumen de las mutaciones detectadas en los genes *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*.

<i>ALOX12B</i>			
Caso	Diagnóstico	Mutación	Descrita
6413	IL	c.397A>G p.R133G Homocigosis	No
17034	IL	c.406_408delGAG p.136delE Homocigosis	Sí
17199	IL	c.406_408delGAG p.136delE Heterocigosis	Sí
		c.1192C>T p.H398Y Heterocigosis	Sí
23100	IL	c.1732C>T p.H578Y Homocigosis	No
23698	-	c.1562A>G p.Y521C Heterocigosis	Sí
		c.1790C>A p.A597E Heterocigosis	Sí
26179	BCA	c.1271_1272insC p.Y424YfsX24 Heterocigosis	Sí
		c.1594G>A p.E532K Heterocigosis	No
<i>ALOXE3</i>			
2359	IL	c.1889C>T p.P630L Heterocigosis	Sí
<i>NIPAL4</i>			
17272	IL	c.527C>A p.A176D Homocigosis	Sí
<i>CYP4F22</i>			
21275	EIC	c.728G>A p.R243H Homocigosis	Sí
22223	BCA	c.1303C>T p.H435Y Homocigosis	Sí
24027	IL	c.1303C>T p.H435Y Homocigosis	Sí

5.6 ASOCIACIÓN GENOTIPO~FENOTIPO

Se han publicado numerosos estudios que han intentado mostrar asociaciones entre las mutaciones detectadas en el grupo de genes implicados en la aparición de ICAR, y los hallazgos ultraestructurales o la clínica, sin que hasta la fecha se haya demostrado una correlación estricta [72, 208, 209, 218, 219, 248, 249].

En nuestro estudio, en 11 de los 15 pacientes con diagnóstico presuntivo de IL se detectaron variantes nucleotídicas: 6 en *TGMI*, 4 en *ALOX12B*, 1 en *ALOXE3*, 1 en *NIPAL4* y 1 en *CYP4F22*. De los 7 casos con diagnóstico de EIC, 2 de ellos mostraron mutaciones en el gen *TGMI* y 1 en *CYP4F22*. Los 4 probandos diagnosticados de BCA presentaron cambios nucleotídicos: 2 de ellos en *TGMI*, 1 en *ALOX12B* y el último de ellos en *CYP4F22*. En los 2 casos diagnosticados de ITB, 1 de ellos presentó mutaciones en el gen *TGMI*. Por último, el caso catalogado sin clasificar, porque no constaba en la petición de estudio genético su diagnóstico presuntivo, presentó mutaciones en el gen *ALOX12B*.

En 7 de los 29 probandos estudiados no se detectaron mutaciones, en ninguno de estos 5 genes, confirmando que las ICAR son entidades clínica y genéticamente heterogéneas, por lo que nos planteamos el análisis de otros genes asociados con el desarrollo de ICAR, como son los genes *ABCA12* [61, 62], *LIPN* [73] y *PNPLA1* [74], estos dos últimos descritos recientemente, y la búsqueda de nuevas regiones cromosómicas que puedan estar implicadas.

Como muestran a grandes rasgos los datos de la relación genotipo-fenotipo obtenidos, los diversos fenotipos de ICAR pueden ser desencadenados por la presencia de mutaciones en cualquiera de los 5 genes analizados; por ello, no se ha

podido establecer una correlación clara hasta la fecha. Además, una posible explicación a la heterogeneidad clínica es el tipo de mutación y su localización dentro del gen; así, deleciones, inserciones o mutaciones en áreas críticas causan una mayor pérdida de actividad de la proteína y un cuadro más severo que las mutaciones en áreas menos importantes que darían como resultado un fenotipo más atenuado [19, 248, 249]. Es de gran importancia aportar más datos genéticos, ultraestructurales y clínicos para poder ayudar a clarificar esta correlación.

En general los pacientes con mutaciones en el gen *TGMI* están afectados con mayor gravedad que los que no las tienen. Un estudio de 83 pacientes con ICAR mostró asociación entre la presencia de ectropión y membrana colodión y mutaciones en *TGMI*, así como mayor frecuencia de eritema en pacientes sin mutaciones en este gen [250]. Otro trabajo describió la relación de las mutaciones en *TGMI* con el tipo de escamas, al evidenciar que el 100% de los pacientes con mutaciones presentaban escamas de tipo laminar, mientras que el 80% de los pacientes sin mutaciones presentaban descamación fina [13]. También se ha propuesto que las mutaciones *nonsense* se asocian más frecuentemente a hipohidrosis y alteraciones en la sudoración que las mutaciones *missense* [56]. En la población norteamericana se ha desarrollado un modelo, que predice que los pacientes que nacen con membrana colodión y presentan problemas oculares y/o alopecia tienen 4 veces más probabilidades de tener mutaciones en *TGMI* [56].

Los pacientes con mutaciones en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* presentan habitualmente cuadro clínico de EIC. Hasta el 76% de ellos nacen como bebés colodión y el 88% presentan alteraciones en la sudoración. Los pacientes con mutaciones en *ALOX12B* muestran descamación discreta y blanquecina en

comparación con los portadores de mutaciones en el gen *ALOXE3* que tienen escamas marronáceas y adherentes. La presencia de eritema y la hiperqueratosis palmoplantar también se asocia a defectos en el gen *ALOX12B* [76].

El espectro clínico en los pacientes con mutaciones en el gen *NIPAL4* es muy amplio, incluso dentro de la misma familia. La membrana colodión al nacimiento está presente desde el 60% [218] al 3.7% [219] de los casos. Cuando la membrana desaparece la mayoría de los pacientes desarrollan un cuadro de EIC, con frecuencia presentan queratodermia palmoplantar de color amarilla y, en ocasiones, contracturas de los dedos y curvatura de las uñas [220, 221]. En algunos trabajos se han descrito rasgos más típicos de IL [218, 219].

En las familias con mutaciones en el gen *CYP4F22*, la mayoría de sus probandos presentaron un fenotipo de EIC al nacer que progresó a IL [72]. Es frecuente la hiperqueratosis palmoplantar y la descamación en el cuero cabelludo. Sin embargo, en otra familia estudiada los miembros afectados nacieron como bebé colodión y desarrollaron un cuadro de eritrodermia intensa, descamación generalizada y queratodermia palmoplantar [224].

Para finalizar, debemos destacar la importancia del hallazgo de mutaciones a la hora de confirmar el diagnóstico y detectar portadores, y con ello poder ofrecer a las familias la oportunidad de realizar un diagnóstico prenatal. En este trabajo, además de encontrar mutaciones causantes de ICAR ya conocidas, se describen nuevas variantes nucleotídicas, y con ellas aporta más datos que nos conducen a una mayor **aproximación genética al estudio de las ictiosis**.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. Nuestro estudio confirma que las ICAR presentan una base genética heterogénea. El 76% de los pacientes presentaron variantes nucleotídicas en alguno de los genes analizados: el 38% en el gen *TGMI*; el 21% en *ALOX12B*; el 3.5% en *ALOXE3*; el 3.5% en *NIPAL4*; y el 10% en *CYP4F22*. Una distribución similar a la encontrada en otras poblaciones.

2. Describimos por primera vez seis nuevas mutaciones en el gen *TGMI* (c.1-915_-916insC, p.L150P, p.A354V, p.G524V, p.E706X, y p.R814X) y tres mutaciones en el gen *ALOX12B* (p.R133G, p.E532K y p.H578Y). El hallazgo de nuevas mutaciones patogénicas confirma la variabilidad genética de la enfermedad y facilita el diagnóstico y la detección de portadores.

3. La observación de hasta un 24% de casos fenotípicamente compatibles con ICAR en los que no se encuentran mutaciones indica que es necesario el estudio de otros genes que puedan estar implicados en el desarrollo de la enfermedad.

4. La realización de estudios genéticos en grandes cohortes de pacientes con ICAR y la recopilación exhaustiva de datos fenotípicos es de gran importancia para poder llevar a cabo una correlación clínico-biológica que permita mejorar la clasificación de estas enfermedades.

ABREVIATURAS



7. ABREVIATURAS

A (aa): alanina

A (nucleótido): adenina

aa: aminoácido

ABCA12: proteína ABCA12

ABCA12: gen de la proteína ABCA12

AD: autosómico dominante

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

Ala: alanina

ALOXE3: gen de la lipoxigenasa E3

ALOX12B: gen de la lipoxigenasa 12B

ALOX15B: gen de la lipoxigenasa 15B

ALOX15P: gen de la lipoxigenasa 15P

AMPS: amonio persulfato

Asn: asparagina

AR: autosómico recesivo

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Asp: ácido aspártico

ATP: adenosín trifosfato

BC: bebé colodión

BCA: bebé colodión autorresolutivo

c.: ADN copia

C (aa): cisteína

C (nucleótido): citosina

Ca²⁺: calcio iónico

C-C: puente carbono-carbono

CIAA: cloroformo alcohol isoamílico

CpG: isla CpG

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CYP4F22: proteína CYP4F22

CYP4F22: gen del citocromo P450 4F22

Cys: cisteína

D (aa): ácido aspártico

dATP: desoxirriboadenina trifosfato

dCTP: desoxirribocitosina trifosfato

ddH₂O: agua bidestilada

del: delección

dGTP: desoxirriboguanina trifosfato

dHPLC: *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante)

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

dTTP: desoxirribotimina trifosfato

E: ácido glutámico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EIC: eritrodermia ictiosiforme congénita

eLOX-3: proteína epidérmica LOX-3

EtOH: etanol

EX: exón

F (aa): fenilalanina

F: oligonucleótido *forward* (sentido)

FLG: gen de la filagrina

fs: *frameshift* (cambio del marco de lectura)

g.: genómico

G (aa): glicina

G (nucleótido): guanina

Glu: glutamato

Gly: glicina

GTP: guanosín trifosfato

H (aa): histidina

His: histidina

ICAR: ictiosis congénita autosómica recesiva

IL: ictiosis laminar

ins: inserción

ITB: ictiosis en traje de baño

K: lisina

Kb: kilobase

KCl: cloruro de potasio

kDa: kilodalton

L: leucina

Leu: leucina

LIPN: gen de la lipasa epidérmica N

M (aa): metionina

M: molar

Met: metionina

MgCl₂: cloruro de magnesio

mg/L: miligramo/litro

min: minuto

mL: mililitro

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (amplificación multiplex dependiente de ligación de sonda)

mM: milimolar

N (aa): asparagina

NIPAL4: gen del receptor de membrana NIPAL4

nm: nanómetro

N-terminal: extremo amino terminal

p: brazo corto del cromosoma

p.: proteína

P: prolina

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

pH: *pondus hydrogenium*

Phe: fenilalanina

pmol: picomol

PNPLA1: gen de la fosfolipasa epidérmica PNPLA1

PolyPhen: *Polymorphism Phenotyping* (fenotipado por polimorfismos)

PPRs: pequeñas proteínas ricas en prolina

Pro: prolina

q: brazo largo del cromosoma

Q: glutamina

R (aa): arginina

R: oligonucleótido *reverse* (anti-sentido)

rs: *reference sequence* (secuencia de referencia)

s: segundo

S: serina

SDS: dodecil sulfato sódico

Ser: serina

SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant* (clasificación de tolerada/intolerada)

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de un único nucleótido)

T (aa): treonina

T (nucleótido): timina

Ta: temperatura de anillamiento

Taq polimerasa: polimerasa de *Termophilus aquaticus*

TBE: Tris, ácido bórico y EDTA

TEAA: trimetilamonio

TEMED: N, N, N, N tetrametilendiamina

Ter (aa): codón de terminación

tgm: proteína transglutaminasa

TGMI: gen de la transglutaminasa 1

Thr: treonina

Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano hidroclorehídrico

Trp: triptófano

Tyr: tirosina

UTR: *untranslated region* (region no traducida)

UV: ultravioleta

V: valina

W: triptófano

X: codón de terminación

XD: ligado al cromosoma X dominante

XR: ligado al cromosoma X recesivo

Y: tirosina

μg: microgramo

μL: microlitro

°C: grado centígrado

*****: después del codón de parada

>: sustitución en la nomenclatura de mutaciones

12R-LOX: proteína epidérmica 12R-LOX

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gabriele, R., *Molecular Genetics of the Ichthyoses*, 2004.
2. Schmuth, M., et al., *Ichthyosis update: towards a function-driven model of pathogenesis of the disorders of cornification and the role of corneocyte proteins in these disorders*. *Adv Dermatol*, 2007. **23**: p. 231-56.
3. Willam, R., *On cutaneous diseases*, 1808.
4. Frost, P., G.D. Weinstein, and E.J. Van Scott, *The ichthyosiform dermatoses. II. Autoradiographic studies of epidermal proliferation*. *J Invest Dermatol*, 1966. **47**(6): p. 561-7.
5. Webster, D., et al., *X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency*. *Lancet*, 1978. **1**(8055): p. 70-2.
6. Unamuno Pérez, P., *Ictiosis*. *Piel*. 2:9-21, 1987.
7. Traupe, H., *The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counseling, and therapy*, in *Berlín, Springer-Verlag* 1989.
8. Williams, M.L. and P.M. Elias, *Ichthyosis. Genetic heterogeneity, genodermatoses, and genetic counseling*. *Arch Dermatol*, 1986. **122**(5): p. 529-31.
9. Akiyama, M. and H. Shimizu, *An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(5): p. 373-82.

10. Oji, V. and H. Traupe, *Ichthyoses: differential diagnosis and molecular genetics*. Eur.J.Dermatol., 2006. **16**(4): p. 349-359.
11. Oji, V., et al., *Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009*. J Am Acad Dermatol, 2010. **63**(4): p. 607-41.
12. Pigg, M., et al., *Strong founder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway*. Eur.J.Hum.Genet., 1998. **6**(6): p. 589-596.
13. Rodriguez-Pazos, L., et al., *Analysis of TGMI, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 and CYP4F22 in autosomal recessive congenital ichthyosis from Galicia (NW Spain): evidence of founder effects*. Br J Dermatol, 2011. **165**(4): p. 906-11.
14. Rodriguez-Pazos, L., et al., *Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis*. Actas Dermosifiliogr, 2012.
15. Hernandez-Martin, A., et al., *Prevalence of autosomal recessive congenital ichthyosis: A population-based study using the capture-recapture method in Spain*. J Am Acad Dermatol, 2012. **67**(2): p. 240-4.
16. Fachal, L., et al., *Multiple local and recent founder effects of TGMI in Spanish families*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33580.
17. Williams, M.L. and P.M. Elias, *Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma*. Arch Dermatol, 1985. **121**(4): p. 477-88.

18. Williams, M.L. and P.M. Elias, *Elevated n-alkanes in congenital ichthyosiform erythroderma. Phenotypic differentiation of two types of autosomal recessive ichthyosis*. J.Clin.Invest, 1984. **74**(1): p. 296-300.
19. Akiyama, M., *Harlequin ichthyosis and other autosomal recessive congenital ichthyoses: the underlying genetic defects and pathomechanisms*. J.Dermatol.Sci., 2006. **42**(2): p. 83-89.
20. Akiyama, M., *ABCA12 mutations and autosomal recessive congenital ichthyosis: a review of genotype/phenotype correlations and of pathogenetic concepts*. Hum Mutat, 2010. **31**(10): p. 1090-6.
21. Rajpopat, S., et al., *Harlequin ichthyosis: a review of clinical and molecular findings in 45 cases*. Arch Dermatol, 2011. **147**(6): p. 681-6.
22. Williams, M.L. and P.M. Elias, *Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma*. Arch.Dermatol., 1985. **121**(4): p. 477-488.
23. Larregue, M., et al., *[Collodion baby: 32 new case reports]*. Ann.Dermatol.Venereol., 1986. **113**(9): p. 773-785.
24. Peña Penabad C., G.J., Unamuno Pérez P., *Ictiosis laminar: revisión y aportaciones recientes*. Piel;12: 128-37, 1997.
25. Peña Penabad C., G.S.J., Unamuno Pérez P., *Novedades en ictiosis*. Arch.Dermatol (ed esp) 10: 260-67, 1999.

26. Akiyama, M., D. Sawamura, and H. Shimizu, *The clinical spectrum of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis*. Clin Exp Dermatol, 2003. **28**(3): p. 235-40.
27. Peña Penabad C., G.S.J., Unamuno Pérez P., *Estudio clínico e histopatológico de 17 casos de ictiosis laminar*. Actas Dermosifiliogr; 87: 381-9, 1996.
28. Van, G.D., et al., *Collodion baby: a follow-up study of 17 cases*. J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol., 2002. **16**(5): p. 472-475.
29. Larregue, M. and G. Guillet, [*Collodion baby with neonatal signs of trichothiodystrophy misdiagnosed as Netherton syndrome: reassessment of a previous diagnostic error*]. Ann Dermatol Venereol, 2007. **134**(3 Pt 1): p. 245-8.
30. Thomas, C., et al., *A child with hypohidrotic ectodermal dysplasia with features of a collodion membrane*. Pediatr Dermatol, 2006. **23**(3): p. 251-4.
31. Reed, W.B., et al., *Lamellar ichthyosis of the newborn. A distinct clinical entity: its comparison to the other ichthyosiform erythrodermas*. Arch Dermatol, 1972. **105**(3): p. 394-9.
32. Frenk, E. and F. de Techtermann, *Self-healing collodion baby: evidence for autosomal recessive inheritance*. Pediatr Dermatol, 1992. **9**(2): p. 95-7.
33. Vahlquist, A., et al., *Genotypic and clinical spectrum of self-improving collodion ichthyosis: ALOX12B, ALOXE3, and TGM1 mutations in Scandinavian patients*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 438-43.

34. Finlay, H.V. and J.P. Bound, *Collodion skin in the neonate due to lamellar ichthyosis*. Arch Dis Child, 1952. **27**(135): p. 438-41.
35. Mazereeuw-Hautier, J., et al., *Acral self-healing collodion baby: report of a new clinical phenotype caused by a novel TGM1 mutation*. Br J Dermatol, 2009. **161**(2): p. 456-63.
36. Harting, M., et al., *Self-healing collodion membrane and mild nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma due to 2 novel mutations in the ALOX12B gene*. Arch Dermatol, 2008. **144**(3): p. 351-6.
37. Muramatsu, S., et al., *A Japanese patient with a mild form of lamellar ichthyosis harbouring two missense mutations in the core domain of the transglutaminase 1 gene*. Br J Dermatol, 2004. **150**(2): p. 390-2.
38. Petit, E., et al., *Three novel point mutations in the keratinocyte transglutaminase (TGK) gene in lamellar ichthyosis: significance for mutant transcript level, TGK immunodetection and activity*. Eur.J.Hum.Genet., 1997. **5**(4): p. 218-228.
39. Yang, J.M., et al., *Novel mutations of the transglutaminase 1 gene in lamellar ichthyosis*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(2): p. 214-8.
40. Jacyk, W.K., *Bathing-suit ichthyosis. A peculiar phenotype of lamellar ichthyosis in South African blacks*. Eur J Dermatol, 2005. **15**(6): p. 433-6.
41. Trindade, F., et al., *Bathing suit ichthyosis*. Eur J Dermatol, 2010. **20**(4): p. 447-50.

42. Arita, K., et al., *The South African "bathing suit ichthyosis" is a form of lamellar ichthyosis caused by a homozygous missense mutation, p.R315L, in transglutaminase 1*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(2): p. 490-3.
43. Oji, V., et al., *Bathing suit ichthyosis is caused by transglutaminase-1 deficiency: evidence for a temperature-sensitive phenotype*. *Hum.Mol.Genet.*, 2006. **15**(21): p. 3083-3097.
44. Russell, L.J., et al., *Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q*. *Am.J.Hum.Genet.*, 1994. **55**(6): p. 1146-1152.
45. Huber, M., et al., *Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis*. *Science*, 1995. **267**(5197): p. 525-8.
46. Russell, L.J., et al., *Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis*. *Nat.Genet.*, 1995. **9**(3): p. 279-283.
47. Parmentier, L., et al., *Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity*. *Hum.Mol.Genet.*, 1995. **4**(8): p. 1391-1395.
48. Huber, M., et al., *Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase*. *J.Biol.Chem.*, 1997. **272**(34): p. 21018-21026.
49. Laiho, E., et al., *Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population*. *Am.J.Hum.Genet.*, 1997. **61**(3): p. 529-538.

50. Schorderet, D.F., et al., *Prenatal diagnosis of lamellar ichthyosis by direct mutational analysis of the keratinocyte transglutaminase gene*. Prenat.Diagn., 1997. **17**(5): p. 483-486.
51. Bichakjian, C.K., et al., *Prenatal exclusion of lamellar ichthyosis based on identification of two new mutations in the transglutaminase 1 gene*. J.Invest Dermatol., 1998. **110**(2): p. 179-182.
52. Hennies, H.C., et al., *Genetic and immunohistochemical detection of mutations inactivating the keratinocyte transglutaminase in patients with lamellar ichthyosis*. Hum.Genet., 1998. **102**(3): p. 314-318.
53. Hennies, H.C., et al., *Genotype/phenotype correlation in autosomal recessive lamellar ichthyosis*. Am.J.Hum.Genet., 1998. **62**(5): p. 1052-1061.
54. Shevchenko, Y.O., et al., *Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies*. Hum.Genet., 2000. **106**(5): p. 492-499.
55. Herman, M.L., et al., *Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1*. Hum Mutat, 2009. **30**(4): p. 537-47.
56. Farasat, S., et al., *Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA*. J Med Genet, 2009. **46**(2): p. 103-11.
57. Akiyama, M., et al., *Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma*. Br J Dermatol, 2001. **144**(2): p. 401-7.

58. Becker, K., et al., *Identification of two novel nonsense mutations in the transglutaminase 1 gene in a Hungarian patient with congenital ichthyosiform erythroderma*. *Exp.Dermatol.*, 2003. **12**(3): p. 324-329.
59. Raghunath, M., et al., *Self-healing collodion baby: a dynamic phenotype explained by a particular transglutaminase-1 mutation*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(2): p. 224-8.
60. Hackett, B.C., et al., *Genotype-phenotype correlations with TGM1: clustering of mutations in the bathing suit ichthyosis and self-healing collodion baby variants of lamellar ichthyosis*. *Br J Dermatol*, 2010. **162**(2): p. 448-51.
61. Parmentier, L., et al., *Mapping of a second locus for lamellar ichthyosis to chromosome 2q33-35*. *Hum.Mol.Genet.*, 1996. **5**(4): p. 555-559.
62. Parmentier, L., et al., *Lamellar ichthyosis: further narrowing, physical and expression mapping of the chromosome 2 candidate locus*. *Eur J Hum Genet*, 1999. **7**(1): p. 77-87.
63. Lefevre, C., et al., *Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2*. *Hum.Mol.Genet.*, 2003. **12**(18): p. 2369-2378.
64. Akiyama, M., et al., *Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer*. *J.Clin.Invest*, 2005. **115**(7): p. 1777-1784.
65. Bale, S.J., et al., *Genetic heterogeneity in lamellar ichthyosis*. *J.Invest Dermatol.*, 1996. **107**(1): p. 140-141.

66. Fischer, J., et al., *Two new loci for autosomal recessive ichthyosis on chromosomes 3p21 and 19p12-q12 and evidence for further genetic heterogeneity.* Am.J.Hum.Genet., 2000. **66**(3): p. 904-913.
67. Virolainen, E., et al., *Assignment of a novel locus for autosomal recessive congenital ichthyosis to chromosome 19p13.1-p13.2.* Am J Hum Genet, 2000. **66**(3): p. 1132-7.
68. Krieg, P., F. Marks, and G. Furstenberger, *A gene cluster encoding human epidermis-type lipoygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression.* Genomics, 2001. **73**(3): p. 323-30.
69. Krebsova, A., et al., *Identification, by homozygosity mapping, of a novel locus for autosomal recessive congenital ichthyosis on chromosome 17p, and evidence for further genetic heterogeneity.* Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 216-22.
70. Lefevre, C., et al., *Mutations in ichthyin a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis.* Hum.Mol.Genet., 2004. **13**(20): p. 2473-2482.
71. Mizrachi-Koren, M., et al., *Identification of a novel locus associated with congenital recessive ichthyosis on 12p11.2-q13.* J.Invest Dermatol., 2005. **125**(3): p. 456-462.
72. Lefevre, C., et al., *Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(5): p. 767-76.

73. Israeli, S., et al., *A mutation in LIPN, encoding epidermal lipase N, causes a late-onset form of autosomal-recessive congenital ichthyosis*. *Am J Hum Genet*, 2011. **88**(4): p. 482-7.
74. Grall, A., et al., *PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans*. *Nat Genet*, 2012. **44**(2): p. 140-7.
75. Fischer, J., *Autosomal recessive congenital ichthyosis*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(6): p. 1319-21.
76. Eckl, K.M., et al., *Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(6): p. 1421-8.
77. Peña Penabad C., F.E., Unamuno Pérez P., *Tratamiento de las ictiosis*. *Piel*; 15: 90-96, 2000.
78. Bassotti, A., S. Moreno, and E. Criado, *Successful treatment with topical N-acetylcysteine in urea in five children with congenital lamellar ichthyosis*. *Pediatr Dermatol*, 2011. **28**(4): p. 451-5.
79. Baden, H.P., et al., *Treatment of ichthyosis with isotretinoin*. *J.Am.Acad.Dermatol.*, 1982. **6**(4 Pt 2 Suppl): p. 716-720.
80. Cakmak, A., et al., *Treatment of congenital ichthyosis with acitretin: a case report*. *Minerva Pediatr*, 2010. **62**(6): p. 599-603.

81. Cotsarelis, G., et al., *Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells*. Cell, 1989. **57**(2): p. 201-209.
82. Fuchs, E. and C. Byrne, *The epidermis: rising to the surface*. Curr.Opin.Genet.Dev., 1994. **4**(5): p. 725-736.
83. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, *The cornified envelope: a model of cell death in the skin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 328-40.
84. Eckert, R.L., J.F. Crish, and N.A. Robinson, *The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation*. Physiol Rev., 1997. **77**(2): p. 397-424.
85. Matoltsy, A.G., *Membrane-coating granules of the epidermis*. J.Ultrastruct.Res., 1966. **15**(5): p. 510-515.
86. Lavker, R.M. and A.G. Matoltsy, *Substructure of keratohyalin granules of the epidermis as revealed by high resolution electron microscopy*. J.Ultrastruct.Res., 1971. **35**(5): p. 575-581.
87. Holbrook, K.A. and G.F. Odland, *The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm*. J.Invest Dermatol., 1975. **65**(1): p. 16-38.
88. Lavker, R.M., *Membrane coating granules: the fate of the discharged lamellae*. J.Ultrastruct.Res., 1976. **55**(1): p. 79-86.

89. Ishida-Yamamoto, A., et al., *Loricrin immunoreactivity in human skin: localization to specific granules (L-granules) in acrosyringia*. Arch.Dermatol.Res., 1993. **285**(8): p. 491-498.
90. Steven, A.C., et al., *Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes*. J.Struct.Biol., 1990. **104**(1-3): p. 150-162.
91. Nemes, Z. and P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Exp.Mol.Med., 1999. **31**(1): p. 5-19.
92. Segre, J., *Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier*. Curr.Opin.Cell Biol., 2003. **15**(6): p. 776-782.
93. Matoltsy, A.G. and G.F. Odland, *Investigation of the structure of the cornified epithelium of the human skin*. J.Biophys.Biochem.Cytol., 1955. **1**(3): p. 191-196.
94. Matoltsy, A.G., *Keratinization*. J.Invest Dermatol., 1976. **67**(1): p. 20-25.
95. Steven, A.C. and P.M. Steinert, *Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes*. J.Cell Sci., 1994. **107** (Pt 2): p. 693-700.
96. Nemes, Z., et al., *A novel function for transglutaminase I: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1999. **96**(15): p. 8402-8407.

97. Matoltsy, A.G. and M.N. Matoltsy, *The membrane protein of horny cells*. J.Invest Dermatol., 1966. **46**(1): p. 127-129.
98. Elias, P.M. and D.S. Friend, *The permeability barrier in mammalian epidermis*. J.Cell Biol., 1975. **65**(1): p. 180-191.
99. Grayson, S. and P.M. Elias, *Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membrane complexes: implications for the cutaneous permeability barrier*. J.Invest Dermatol., 1982. **78**(2): p. 128-135.
100. Wertz, P.W., et al., *The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum*. J.Invest Dermatol., 1989. **93**(1): p. 169-172.
101. Robinson, N.A., et al., *S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes*. J.Biol.Chem., 1997. **272**(18): p. 12035-12046.
102. Steinert, P.M. and L.N. Marekov, *Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia*. Mol.Biol.Cell, 1999. **10**(12): p. 4247-4261.
103. Eckert, R.L., et al., *Transglutaminase function in epidermis*. J.Invest Dermatol., 2005. **124**(3): p. 481-492.
104. Gibbs, S., et al., *Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins*. Genomics, 1993. **16**(3): p. 630-637.

105. South, A.P., et al., *Human epidermal differentiation complex in a single 2.5 Mbp long continuum of overlapping DNA cloned in bacteria integrating physical and transcript maps*. *J.Invest Dermatol.*, 1999. **112**(6): p. 910-918.
106. Zhao, X.P. and J.T. Elder, *Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex*. *Genomics*, 1997. **45**(2): p. 250-258.
107. Eckert, R.L., et al., *Involucrin--structure and role in envelope assembly*. *J.Invest Dermatol.*, 1993. **100**(5): p. 613-617.
108. Kalinin, A.E., A.V. Kajava, and P.M. Steinert, *Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope*. *Bioessays*, 2002. **24**(9): p. 789-800.
109. Mehrel, T., et al., *Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin*. *Cell*, 1990. **61**(6): p. 1103-1112.
110. Hohl, D., et al., *Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins*. *J.Biol.Chem.*, 1991. **266**(10): p. 6626-6636.
111. Buxman, M.M. and K.D. Wuepper, *Isolation, purification and characterization of bovine epidermal transglutaminase*. *Biochim.Biophys.Acta*, 1976. **452**(2): p. 356-369.
112. Goldsmith, L.A., *Human epidermal transglutaminase*. *J.Invest Dermatol.*, 1983. **80 Suppl**: p. 39s-41s.

113. Peterson, L.L. and K.D. Wuepper, *Epidermal and hair follicle transglutaminases and crosslinking in skin*. Mol.Cell Biochem., 1984. **58**(1-2): p. 99-111.
114. Rothnagel, J.A. and G.E. Rogers, *Transglutaminase-mediated cross-linking in mammalian epidermis*. Mol.Cell Biochem., 1984. **58**(1-2): p. 113-119.
115. Thacher, S.M. and R.H. Rice, *Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation*. Cell, 1985. **40**(3): p. 685-695.
116. Michel, S. and M. Demarchez, *Localization and in vivo activity of epidermal transglutaminase*. J.Invest Dermatol., 1988. **90**(4): p. 472-474.
117. Kim, H.C., et al., *The complete amino acid sequence of the human transglutaminase K enzyme deduced from the nucleic acid sequences of cDNA clones*. J.Biol.Chem., 1991. **266**(1): p. 536-539.
118. Kim, S.Y., et al., *Expression of transglutaminase 1 in human epidermis*. J.Invest Dermatol., 1995. **104**(2): p. 211-217.
119. Polakowska, R., E. Herting, and L.A. Goldsmith, *Isolation of cDNA for human epidermal type I transglutaminase*. J.Invest Dermatol., 1991. **96**(2): p. 285-288.
120. Hitomi, K., et al., *Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides*. J.Biochem., 1999. **125**(6): p. 1048-1054.

121. Hitomi, K., et al., *Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies*. J.Dermatol.Sci., 2003. **32**(2): p. 95-103.
122. Yardley, H.J. and R. Summerly, *Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis*. Pharmacol Ther, 1981. **13**(2): p. 357-83.
123. Hovnanian, A., *Harlequin ichthyosis unmasked: a defect of lipid transport*. J.Clin.Invest, 2005. **115**(7): p. 1708-1710.
124. Ogawa, H. and L.A. Goldsmith, *Human epidermal transglutaminase. Preparation and properties*. J Biol Chem, 1976. **251**(23): p. 7281-8.
125. Coussons, P.J., et al., *Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides*. Biochem.J., 1992. **282** (Pt 3): p. 929-930.
126. Griffin, M., R. Casadio, and C.M. Bergamini, *Transglutaminases: nature's biological glues*. Biochem.J., 2002. **368**(Pt 2): p. 377-396.
127. Kanaji, T., et al., *Primary structure of microbial transglutaminase from Streptovercillium sp. strain s-8112*. J.Biol.Chem., 1993. **268**(16): p. 11565-11572.
128. Del, D.S., S. Beninati, and D. Serafini-Fracassini, *Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives*. Biochem.J., 1995. **305** (Pt 1): p. 233-237.

129. Singh, R.N. and K. Mehta, *Purification and characterization of a novel transglutaminase from filarial nematode Brugia malayi*. Eur J Biochem, 1994. **225**(2): p. 625-34.
130. Zhang, J. and Y. Masui, *Role of amphibian egg transglutaminase in the development of secondary cytotstatic factor in vitro*. Mol Reprod Dev, 1997. **47**(3): p. 302-11.
131. Yasueda, H., Y. Kumazawa, and M. Motoki, *Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (Pagrus major)*. Biosci.Biotechnol.Biochem., 1994. **58**(11): p. 2041-2045.
132. Puszkin, E.G. and V. Raghuraman, *Catalytic properties of a calmodulin-regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard*. J.Biol.Chem., 1985. **260**(29): p. 16012-16020.
133. Phillips, M.A., et al., *Primary structure of keratinocyte transglutaminase*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1990. **87**(23): p. 9333-9337.
134. Aeschlimann, D., et al., *Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers*. J.Biol.Chem., 1998. **273**(6): p. 3452-3460.
135. Grenard, P., M.K. Bates, and D. Aeschlimann, *Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and*

a novel gene family member, transglutaminase Z. J.Biol.Chem., 2001. **276**(35): p. 33066-33078.

136. Siefring, G.E., Jr., et al., *Enzymatic basis for the Ca²⁺-induced cross-linking of membrane proteins in intact human erythrocytes*. Biochemistry, 1978. **17**(13): p. 2598-2604.

137. Lorand, L. and R.M. Graham, *Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions*. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2003. **4**(2): p. 140-156.

138. Dubbink, H.J., et al., *The human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4): genomic organization, tissue-specific expression, and promoter characterization*. Genomics, 1998. **51**(3): p. 434-444.

139. Lorand, L., et al., *Inhibition of protein cross-linking in Ca²⁺-enriched human erythrocytes and activated platelets*. Biochemistry, 1987. **26**(1): p. 308-313.

140. Fesus, L. and M. Piacentini, *Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions*. Trends Biochem.Sci., 2002. **27**(10): p. 534-539.

141. Polakowska, R.R., et al., *Epidermal type I transglutaminase (TGM1) is assigned to human chromosome 14*. Cytogenet.Cell Genet., 1991. **56**(2): p. 105-107.

142. Kim, I.G., et al., *Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family*. J.Invest Dermatol., 1994. **103**(2): p. 137-142.

143. Candi, E., et al., *Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro*. J.Biol.Chem., 2001. **276**(37): p. 35014-35023.
144. Candi, E., et al., *Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis*. J.Invest Dermatol., 2002. **119**(3): p. 670-677.
145. Candi, E., et al., *Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides*. Biochem.J., 2004. **381**(Pt 1): p. 313-319.
146. Ahvazi, B., et al., *Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation*. EMBO J., 2002. **21**(9): p. 2055-2067.
147. Kim, I.G., et al., *Structure and organization of the human transglutaminase I gene*. J.Biol.Chem., 1992. **267**(11): p. 7710-7717.
148. Boeshans, K.M., T.C. Mueser, and B. Ahvazi, *A three-dimensional model of the human transglutaminase I: insights into the understanding of lamellar ichthyosis*. J.Mol.Model., 2007. **13**(1): p. 233-246.
149. Polakowska, R.R., et al., *Organization and evolution of the human epidermal keratinocyte transglutaminase I gene*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1992. **89**(10): p. 4476-4480.
150. Yamanishi, K., et al., *Structure of the gene for human transglutaminase I*. J.Biol.Chem., 1992. **267**(25): p. 17858-17863.

151. Thacher, S.M., *Purification of keratinocyte transglutaminase and its expression during squamous differentiation*. J.Invest Dermatol., 1989. **92**(4): p. 578-584.
152. Hohl, D., *Cornified cell envelope*. Dermatologica, 1990. **180**(4): p. 201-11.
153. Greenberg, C.S., P.J. Birckbichler, and R.H. Rice, *Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues*. FASEB J., 1991. **5**(15): p. 3071-3077.
154. Floyd, E.E. and A.M. Jetten, *Regulation of type I (epidermal) transglutaminase mRNA levels during squamous differentiation: down regulation by retinoids*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(11): p. 4846-51.
155. Liew, F.M. and K. Yamanishi, *Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in cultured human keratinocytes*. Exp Cell Res, 1992. **202**(2): p. 310-5.
156. Yamada, K., et al., *Transcriptional regulation of human transglutaminase1 gene by signaling systems of protein kinase C, RAR/RXR and Jun/Fos in keratinocytes*. Biochem Mol Biol Int, 1994. **34**(4): p. 827-36.
157. Mariniello, L., et al., *Keratinocyte transglutaminase promoter analysis. Identification of a functional response element*. J.Biol.Chem., 1995. **270**(52): p. 31358-31363.

158. Medvedev, A., et al., *Regulation of the transglutaminase I gene. Identification of DNA elements involved in its transcriptional control in tracheobronchial epithelial cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3887-96.
159. Jessen, B.A., et al., *Role of Sp1 response element in transcription of the human transglutaminase I gene.* J Invest Dermatol., 2000. **115**(1): p. 113-117.
160. Jessen, B.A., et al., *Keratinocyte differentiation marker suppression by arsenic: mediation by AP1 response elements and antagonism by tetradecanoylphorbol acetate.* Toxicol.Appl.Pharmacol., 2001. **174**(3): p. 302-311.
161. Phillips, M.A., et al., *A distal region of the human TGM1 promoter is required for expression in transgenic mice and cultured keratinocytes.* BMC.Dermatol., 2004. **4**: p. 2.
162. Sakai, K., et al., *ABCA12 is a major causative gene for non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(9): p. 2306-9.
163. Terrinoni, A., et al., *Novel transglutaminase I mutations in patients affected by lamellar ichthyosis.* Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e416.
164. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, *DNA methylation in health and disease.* Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 11-9.
165. Cooper, D.N. and H. Youssoufian, *The CpG dinucleotide and human genetic disease.* Hum Genet, 1988. **78**(2): p. 151-5.

166. Phillips, M.A., et al., *Keratinocyte transglutaminase membrane anchorage: analysis of site-directed mutants*. *Biochemistry*, 1993. **32**(41): p. 11057-11063.

167. Steinert, P.M., S.I. Chung, and S.Y. Kim, *Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase I enzyme in human epidermal keratinocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(1): p. 101-6.

168. Chakravarty, R., X.H. Rong, and R.H. Rice, *Phorbol ester-stimulated phosphorylation of keratinocyte transglutaminase in the membrane anchorage region*. *Biochem.J.*, 1990. **271**(1): p. 25-30.

169. Rice, R.H., et al., *Identification of phosphorylation sites in keratinocyte transglutaminase*. *Biochem.J.*, 1996. **320** (Pt 2): p. 547-550.

170. Hennings, H., P. Steinert, and M.M. Buxman, *Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981. **102**(2): p. 739-45.

171. Menon, G.K., S. Grayson, and P.M. Elias, *Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry*. *J Invest Dermatol*, 1985. **84**(6): p. 508-12.

172. Boyce, S.T. and R.G. Ham, *Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture*. *J Invest Dermatol*, 1983. **81**(1 Suppl): p. 33s-40s.

173. Hennings, H., et al., *Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes*. *Carcinogenesis*, 1989. **10**(4): p. 777-80.
174. Saunders, N.A., et al., *Regulation of transglutaminase type I expression in squamous differentiating rabbit tracheal epithelial cells and human epidermal keratinocytes: effects of retinoic acid and phorbol esters*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**(3): p. 387-98.
175. Backendorf, C. and D. Hohl, *A common origin for cornified envelope proteins?* *Nat Genet*, 1992. **2**(2): p. 91.
176. Rice, R.H. and H. Green, *Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions*. *Cell*, 1979. **18**(3): p. 681-94.
177. Ishida-Yamamoto, A. and H. Iizuka, *Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis*. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**(3): p. 391-5.
178. Simon, M. and H. Green, *Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro*. *Cell*, 1985. **40**(3): p. 677-83.
179. Etoh, Y., M. Simon, and H. Green, *Involucrin acts as a transglutaminase substrate at multiple sites*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **136**(1): p. 51-6.
180. Lambert, A., et al., *Transglutaminase reactivity of human involucrin*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2000. **13**(1): p. 17-30.

181. Steinert, P.M. and L.N. Marekov, *Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope*. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 2021-30.
182. Simon, M. and H. Green, *The glutamine residues reactive in transglutaminase-catalyzed cross-linking of involucrin*. J.Biol.Chem., 1988. **263**(34): p. 18093-18098.
183. Ishida-Yamamoto, A., et al., *Antigen retrieval of loricrin epitopes at desmosomal areas of cornified cell envelopes: an immunoelectron microscopic analysis*. Exp Dermatol, 1999. **8**(5): p. 402-6.
184. Tesfaigzi, J. and D.M. Carlson, *Expression, regulation, and function of the SPR family of proteins. A review*. Cell Biochem Biophys, 1999. **30**(2): p. 243-65.
185. Gibbs, S., et al., *Characterization of the human spr2 promoter: induction after UV irradiation or TPA treatment and regulation during differentiation of cultured primary keratinocytes*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(15): p. 4401-7.
186. Presland, R.B., et al., *Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 23772-81.

187. Presland, R.B., et al., *Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(2): p. 170-8.
188. Sandilands, A., et al., *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 9): p. 1285-94.
189. Presland, R.B., et al., *Regulated expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest*. Exp Cell Res, 2001. **270**(2): p. 199-213.
190. Marekov, L.N. and P.M. Steinert, *Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17763-70.
191. Elias, P.M., M.L. Williams, and K.R. Feingold, *Abnormal barrier function in the pathogenesis of ichthyosis: Therapeutic implications for lipid metabolic disorders*. Clin Dermatol, 2012. **30**(3): p. 311-22.
192. Annilo, T., et al., *Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34*. Cytogenet Genome Res, 2002. **98**(2-3): p. 169-76.
193. Hollenstein, K., D.C. Frei, and K.P. Locher, *Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 213-6.
194. Akiyama, M., *Pathomechanisms of harlequin ichthyosis and ABCA transporters in human diseases*. Arch.Dermatol., 2006. **142**(7): p. 914-918.

195. Akiyama, M., et al., *Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1777-84.
196. Zuo, Y., et al., *ABCA12 maintains the epidermal lipid permeability barrier by facilitating formation of ceramide linoleic esters*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36624-35.
197. Sakai, K., et al., *Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes*. Exp Dermatol, 2007. **16**(11): p. 920-6.
198. Akiyama, M., *The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis*. Dermatoendocrinol, 2011. **3**(2): p. 107-12.
199. Jiang, Y.J., et al., *Ceramide stimulates ABCA12 expression via peroxisome proliferator-activated receptor {delta} in human keratinocytes*. J Biol Chem, 2009. **284**(28): p. 18942-52.
200. Parmentier, L., et al., *Lamellar ichthyosis: further narrowing, physical and expression mapping of the chromosome 2 candidate locus*. Eur.J.Hum.Genet., 1999. **7**(1): p. 77-87.
201. Thomas, A.C., et al., *ABCA12 is the major harlequin ichthyosis gene*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(11): p. 2408-13.
202. Sun, D., et al., *Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33540-7.

203. Boeglin, W.E., R.B. Kim, and A.R. Brash, *A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6744-9.
204. Akiyama, M., et al., *Partially disturbed lamellar granule secretion in mild congenital ichthyosiform erythroderma with ALOX12B mutations*. Br J Dermatol, 2010. **163**(1): p. 201-4.
205. Heidt, M., et al., *Diversity of mouse lipoxygenases: identification of a subfamily of epidermal isozymes exhibiting a differentiation-dependent mRNA expression pattern*. Lipids, 2000. **35**(7): p. 701-7.
206. Furstenberger, G., et al., *Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **82**(1-4): p. 128-34.
207. Yu, Z., et al., *The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9162-7.
208. Jobard, F., et al., *Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(1): p. 107-13.
209. Eckl, K.M., et al., *Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis*. Hum Mutat, 2005. **26**(4): p. 351-61.

210. Ashoor, G., et al., *A novel mutation in the 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) gene underlies nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma*. *Br J Dermatol*, 2006. **155**(1): p. 198-200.
211. Lesueur, F., et al., *Novel mutations in ALOX12B in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and evidence for genetic heterogeneity on chromosome 17p13*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(4): p. 829-34.
212. Kurban, M., et al., *Nonsense mutation in the ALOX12B gene leads to autosomal recessive congenital ichthyosis in a Lebanese family*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2010. **24**(2): p. 232-4.
213. Yu, Z., et al., *Mutations associated with a congenital form of ichthyosis (NCIE) inactivate the epidermal lipoxygenases 12R-LOX and eLOX3*. *Biochim.Biophys.Acta*, 2005. **1686** **3**: p. 238-247.
214. de Juanes, S., et al., *Development of an ichthyosiform phenotype in Alox12b-deficient mouse skin transplants*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(6): p. 1429-36.
215. Epp, N., et al., *12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function*. *J Cell Biol*, 2007. **177**(1): p. 173-82.
216. Moran, J.L., et al., *A mouse mutation in the 12R-lipoxygenase, Alox12b, disrupts formation of the epidermal permeability barrier*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(8): p. 1893-7.

217. Krieg, P., et al., *Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipooxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 172-80.
218. Lefevre, C., et al., *Mutations in ichthyin a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis.* Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2473-82.
219. Dahlqvist, J., et al., *Congenital ichthyosis: mutations in ichthyin are associated with specific structural abnormalities in the granular layer of epidermis.* J Med Genet, 2007. **44**(10): p. 615-20.
220. Wajid, M., et al., *NIPAL4/ichthyin is expressed in the granular layer of human epidermis and mutated in two Pakistani families with autosomal recessive ichthyosis.* Dermatology, 2010. **220**(1): p. 8-14.
221. Alavi, A., et al., *Manifestation of diffuse yellowish keratoderma on the palms and soles in autosomal recessive congenital ichthyosis patients may be indicative of mutations in NIPAL4.* J Dermatol, 2012. **39**(4): p. 375-81.
222. Kikuta, Y., E. Kusunose, and M. Kusunose, *Prostaglandin and leukotriene omega-hydroxylases.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 345-62.
223. Jedlitschky, G., et al., *Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end.* J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24763-72.
224. Lugassy, J., et al., *Rapid detection of homozygous mutations in congenital recessive ichthyosis.* Arch.Dermatol.Res., 2007.

225. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York 1989.
226. Orita, M., et al., *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2766-70.
227. Glavac, D. and M. Dean, *Applications of heteroduplex analysis for mutation detection in disease genes*. Hum Mutat, 1995. **6**(4): p. 281-7.
228. Ganguly, A., M.J. Rock, and D.J. Prockop, *Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10325-9.
229. Xiao, W. and P.J. Oefner, *Denaturing high-performance liquid chromatography: A review*. Hum Mutat, 2001. **17**(6): p. 439-74.
230. Kuklin, A., et al., *Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system*. Genet Test, 1997. **1**(3): p. 201-6.
231. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
232. Esposito, G., et al., *Transglutaminase 1 gene mutations in Italian patients with autosomal recessive lamellar ichthyosis*. J.Invest Dermatol., 2001. **116**(5): p. 809-812.

233. Aufenvenne, K., et al., *Transglutaminase-1 and bathing suit ichthyosis: molecular analysis of gene/environment interactions*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 2068-71.
234. Jiang, H., et al., *Type I transglutaminase accumulation in the endoplasmic reticulum may be an underlying cause of autosomal recessive congenital ichthyosis*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31634-46.
235. Nakagawa, N., et al., *Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice*. J Dermatol Sci, 2012. **65**(3): p. 196-206.
236. Fachal, L., et al., *Characterization of TGM1 c.984+1G>A mutation identified in a homozygous carrier of lamellar ichthyosis*. Int J Dermatol, 2012. **51**(4): p. 427-30.
237. Candi, E., et al., *Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13693-702.
238. Akiyama, M., et al., *Compound heterozygous TGM1 mutations including a novel missense mutation L204Q in a mild form of lamellar ichthyosis*. J Invest Dermatol., 2001. **116**(6): p. 992-995.
239. Yotsumoto, S., et al., *Analyses of the transglutaminase 1 gene mutation and ultrastructural characteristics in a Japanese patient with lamellar ichthyosis*. J.Dermatol.Sci., 2000. **24**(2): p. 119-125.

240. Rodriguez-Pazos, L., et al., *Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the transglutaminase-1 gene*. Int J Dermatol, 2009. **48**(11): p. 1195-7.

241. Shevchenko, Y.O., et al., *Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies*. Hum Genet, 2000. **106**(5): p. 492-9.

242. Kim, S.Y., et al., *The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 27979-86.

243. Lai, T.S., et al., *Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24596-601.

244. Matsuki, M., et al., *Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase)*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1998. **95**(3): p. 1044-1049.

245. Russell, L.J., et al., *Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 279-83.

246. Cserhalmi-Friedman, P.B., L.M. Milstone, and A.M. Christiano, *Diagnosis of autosomal recessive lamellar ichthyosis with mutations in the TGM1 gene*. Br J Dermatol, 2001. **144**(4): p. 726-30.

247. Bourrat, E., et al., *Specific TGM1 mutation profiles in bathing suit and self-improving collodion ichthyoses: phenotypic and genotypic data from 9 patients*

with dynamic phenotypes of autosomal recessive congenital ichthyosis. Arch Dermatol, 2012. **148**(10): p. 1191-5.

248. Hennies, H.C., et al., *Genotype/phenotype correlation in autosomal recessive lamellar ichthyosis.* Am J Hum Genet, 1998. **62**(5): p. 1052-61.

249. Laiho, E., et al., *Clinical and morphological correlations for transglutaminase 1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis.* Eur.J.Hum.Genet., 1999. **7**(6): p. 625-632.

250. Ganemo, A., et al., *Autosomal recessive congenital ichthyosis in Sweden and Estonia: clinical, genetic and ultrastructural findings in eighty-three patients.* Acta Derm.Venereol., 2003. **83**(1): p. 24-30.