



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA  
ÁREA DE DERMATOLOGÍA

## TESIS DOCTORAL

# ESTUDIO CLÍNICO Y GENÉTICO-MOLECULAR DE LAS ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS EN GALICIA

LAURA RODRÍGUEZ PAZOS

MAYO 2011

---

**D. JAIME TORIBIO PÉREZ**, Catedrático de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología.

**D. MANUEL GINARTE VAL**, Profesor Asociado de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología.

**D<sup>a</sup>. ANA VEGA GLIEMMO**, Adjunta de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.

**CERTIFICAN:**

Que la Licenciada en Medicina, **D<sup>a</sup>. Laura Rodríguez Pazos**, ha realizado bajo nuestra dirección su trabajo de Tesis Doctoral "**Estudio clínico y genético-molecular de las ictiosis autosómicas recesivas en Galicia**".

Que dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido y poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela a once de Mayo de dos mil once.

Fdo.: Prof. J. Toribio

Fdo.: Prof. M. Ginarte

Fdo.: Dra. A. Vega



**LAURA RODRÍGUEZ PAZOS**, doctoranda en el Departamento de Dermatología y Otorrinolaringología.

**INFORMA:**

Que ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada: **"Estudio clínico y genético-molecular de las ictiosis autosómicas recesivas en Galicia"**, para aspirar a obtener el título de Doctor en Medicina.

Santiago de Compostela, mayo de 2011

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Laura Pazos', with a large, stylized initial 'L'.

Fdo.: Laura Rodríguez Pazos





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA  
ÁREA DE DERMATOLOGÍA

## TESIS DOCTORAL

# ESTUDIO CLÍNICO Y GENÉTICO-MOLECULAR DE LAS ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS EN GALICIA

Memoria presentada por Laura Rodríguez Pazos para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Santiago de Compostela, realizada bajo la dirección del Prof. Dr. Jaime Toribio Pérez, del Dr. Manuel Ginarte Val y de la Dra. Ana Vega Gliemmo.

Santiago de Compostela, Mayo 2011

---



---

A mi marido, David.

A mis padres, Arturo y Lori.

---



---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría manifestar mi más sentido agradecimiento a mi maestro, el Prof. Dr. Jaime Toribio Pérez, director de esta Tesis y creador de la Escuela a la que pertenezco, al que siempre tendré admiración y cariño. Agradecerle su orientación y supervisión en este trabajo y toda la motivación y el apoyo que he recibido de él a lo largo de estos cuatro años.

También quiero dar las gracias al Dr. Manuel Ginarte Val y a la Dra. Ana Vega Gliemmo, amigos y codirectores de esta Tesis, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por estar ahí siempre que los necesité. Sin su apoyo y sus consejos no hubiera podido realizar este trabajo.

Especial reconocimiento merece Laura Fachal, con la que me encuentro en deuda, por guiarme en mi incursión en el campo de la genética y por ayudarme cuando lo he necesitado. Sin su ayuda no lo hubiera conseguido.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del Servicio de Dermatología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, en especial a los residentes que me han apoyado en los momentos difíciles, y a todos los dermatólogos de Galicia que colaboraron conmigo remitiéndome sus pacientes. También al Prof. Andrés Beiras, por la realización de la microscopía electrónica.

No puedo dejar de mencionar entre mis más sinceros agradecimientos a los pacientes y a sus familiares, que han comprendido que su colaboración es imprescindible para que podamos conocer cada vez más su enfermedad. Su espíritu de lucha y su capacidad de superación son un ejemplo para mí.

Y por último, un agradecimiento muy especial merecen mi familia y amigos por la comprensión, paciencia y ánimos dados. Ellos han estado a mi lado todos estos años, aceptando mis defectos y apoyándose incondicionalmente. A vosotros os debo todo. Gracias por quererme y cuidarme.



## CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. DEFINICIÓN DE ICTIOSIS HEREDITARIAS.....	3
1.2. HISTORIA DE LAS ICTIOSIS .....	3
1.3. CLASIFICACIÓN CLÍNICA ACTUAL DE LAS ICTIOSIS HEREDITARIAS.....	6
1.3.1. FORMAS NO SINDRÓMICAS DE ICTIOSIS.....	6
1.3.2. FORMAS SINDRÓMICAS DE ICTIOSIS.....	9
1.4. ETIOPATOGENIA DE LAS ICTIOSIS HEREDITARIAS.....	13
1.4.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA CUTÁNEA.....	13
1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ICTIOSIS EN FUNCIÓN DEL DEFECTO SUBYACENTE EN EL PROCESO DE CORNIFICACIÓN .....	18
1.4.2.1. DEFECTOS EN PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL CORNEOCITO.....	18
1.4.2.2. DEFECTOS EN LA ENVOLTURA CORNIFICADA .....	19
1.4.2.3. DEFECTOS EN LOS LIPIDOS INTERCELULARES .....	19
1.4.2.4. OTROS DEFECTOS.....	23
1.5. ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS .....	25

---

<b>1.5.1. ICTIOSIS LAMINAR Y ERITRODERMIA ICTIOSIFORME</b>	
<b>CONGÉNITA .....</b>	<b>25</b>
1.5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	25
1.5.1.2. HISTOPATOLOGÍA .....	26
1.5.1.3. ULTRAESTRUCTURA .....	27
1.5.1.4. ESTUDIOS MOLECULARES.....	31
1.5.1.4.1. TGM1 .....	32
1.5.1.4.2. ALOXE3 Y ALOX12B.....	34
1.5.1.4.3. ICHTHYIN/NIPAL4 .....	36
1.5.1.4.4. CYP4F22.....	38
1.5.1.4.5. ABCA12 .....	40
<b>1.5.2. ICTIOSIS ARLEQUIN.....</b>	<b>42</b>
<b>1.5.3. BEBÉ COLODIÓN. BEBÉ COLODIÓN AUTORRESOLUTIVO.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5.4. BEBÉ COLODIÓN AUTORRESOLUTIVO ACRAL.....</b>	<b>47</b>
<b>1.5.5. ICTIOSIS EN TRAJE DE BAÑO.....</b>	<b>48</b>
<b>1.6. TRATAMIENTO.....</b>	<b>50</b>
<b>1.6.1. BAÑO Y ELIMINACIÓN MECÁNICA DE LAS ESCAMAS.....</b>	<b>51</b>
<b>1.6.2. TRATAMIENTO TÓPICO.....</b>	<b>51</b>
<b>1.6.3. TRATAMIENTO SISTÉMICO .....</b>	<b>53</b>
<b>1.6.4. OTROS CUIDADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>1.7. CONSEJO GENÉTICO Y DIAGNÓSTICO PRENATAL .....</b>	<b>54</b>

---

---

1.8. FUTURAS ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO GÉNICO DE LAS ICTIOSIS .....	56
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	59
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	63
3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	65
3.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	66
3.3. CUANTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL ADN.....	66
3.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES TGM1, ALOXE3, ALOX12B, NIPAL4 Y CYP4F22 .....	67
3.4.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES TGM1, ALOXE3, ALOX12B, NIPAL4 Y CYP4F22 .....	67
3.4.2. COMPROBACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.....	68
3.4.3. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN .....	70
3.4.4. ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE DATOS.....	70
3.5. ESTUDIOS IN SILICO.....	71
3.5.1. ESTUDIO DE VARIANTES MISSENSE.....	71
3.5.2. ESTUDIO DE VARIANTES DE SPLICING .....	74
3.6. ESTUDIOS DE ADN <sub>c</sub> .....	74
3.6.1. EXTRACCIÓN DE ARN.....	74
3.6.2. SÍNTESIS DE ADN <sub>c</sub> .....	74

---

3.6.3. SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS DE DATOS .....	76
3.7. MODELIZACIÓN MOLECULAR.....	76
3.8. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS .....	77
3.8.1. ESTUDIO DE SNPs.....	79
3.8.1.1. SELECCIÓN DE SNPs.....	79
3.8.1.2. GENOTIPADO DE SNPs.....	79
3.8.2. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES .....	81
3.8.2.1. SELECCIÓN DE MICROSATÉLITES .....	81
3.8.2.2. GENOTIPADO DE MICROSATÉLITES.....	81
3.8.3. RECONSTRUCCIÓN DE HAPLOTIPOS.....	82
3.8.4. DATACIÓN DEL ORIGEN DE LAS MUTACIONES FUNDADORAS EN EL GEN TGM1 .....	83
3.9. ESTUDIOS EN POBLACIÓN CONTROL.....	85
3.10. NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES.....	85
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	85
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
4.1. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLOGICO.....	89
4.2. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES .....	98
4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS Y BIOINFORMÁTICOS.....	99
4.3.1. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES MISSENSE .....	105
4.3.1.1. ESTUDIO DE POBLACIÓN CONTROL .....	105

---

---

4.3.1.2. ESTUDIOS IN SILICO .....	105
4.3.1.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR .....	107
<b>4.3.2. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN C.984+1G&gt;A EN EL TGM1 .....</b>	<b>109</b>
4.3.2.1. ESTUDIOS IN SILICO .....	109
4.3.2.2. ANÁLISIS DE ARN.....	111
4.3.2.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR .....	113
<b>4.3.3. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DATACIÓN DE MUTACIONES FUNDADORAS.....</b>	<b>114</b>
4.3.3.1. MUTACIÓN c.2278C>T (p.Arg760X) .....	116
4.3.3.2. MUTACIÓN c.1223_1227delACACA (p.Asp408ValfsX21) .....	118
4.3.3.3. MUTACIÓN c.984+1G>A .....	122
<b>4.4. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO .....</b>	<b>122</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
<b>6. RESUMEN .....</b>	<b>141</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>147</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>151</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>175</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>177</b>
<b>I.1. PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN TGM1 .....</b>	<b>177</b>
<b>I.2. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ALOXE3.....</b>	<b>178</b>

---

I.3. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ALOX12B.....	179
I.4. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN NIPAL4 .....	180
I.5. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN CYP4F22.....	181
I.6. PRIMERS PARA EL ESTUDIO DE SNPs .....	182
I.6.1. PRIMERS DEL MULTIPLEX 1.....	182
I.6.2. PRIMERS DEL MULTIPLEX 2.....	183
I.7. SONDAS PARA EL ESTUDIO DE SNPs.....	184
I.7.1. SONDAS DEL MULTIPLEX 1.....	184
I.7.2. SONDAS DEL MULTIPLEX 2.....	185
I.8. PRIMERS PARA EL ESTUDIO DE MICROSATÉLITES.....	186
<b>ANEXO II. PUBLICACIONES .....</b>	<b>187</b>
II.1. LAMELLAR ICHTHYOSIS WITH A NOVEL HOMOZYGOUS C- TERMINAL MUTATION IN THE TRANSGLUTAMINASE-1 GENE.....	187
II.2. CHARACTERIZATION OF TGM1 C.984+1G>A MUTATION IDENTIFIED IN A HOMOZYGOUS CARRIER OF LAMELLAR ICHTHYOSIS.....	191
II.3. ANALYSIS OF TGM1, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 AND CYP4F22 IN AUTOSOMAL RECESSIVE CONGENITAL ICHTHYOSIS FROM GALICIA (NW SPAIN): EVIDENCE OF FOUNDER EFFECTS.....	204

---

II.4. MULTIPLE LOCAL AND RECENT FOUNDER EFFECTS OF TGM1 SPANISH FAMILIES.....	223
ABREVIATURAS .....	251
GLOSARIO .....	255

---



# 1.INTRODUCCIÓN



## 1.1. DEFINICIÓN DE ICTIOSIS HEREDITARIAS

Las ictiosis hereditarias son desórdenes mendelianos de la cornificación que se caracterizan por afectar a la mayoría del tegumento y se presentan clínicamente con hiperqueratosis, descamación o ambos<sup>1,2</sup>. El término ictiosis deriva de la raíz griega “ichthys”, que significa pez. Este término fue empleado por primera vez por Willan<sup>3</sup> en el año 1808, en una época en la que las características de las enfermedades humanas se comparaban con las del reino animal. Son trastornos genéticos que deben diferenciarse de las ictiosis adquiridas, que se asocian a medicaciones o a otros procesos como neoplasias malignas y enfermedades autoinmunes, inflamatorias, nutricionales, metabólicas, infecciosas y neurológicas. No todas las ictiosis hereditarias se presentan de forma congénita. Algunas, como la ictiosis vulgar y la ictiosis recesiva ligada a X pueden comenzar tardíamente. Las ictiosis son además trastornos generalizados. Por ello, defectos localizados de la queratinización, que se manifiestan en ciertas partes del cuerpo, como las queratosis palmoplantares o las eritroqueratodermias, no se incluyen en este grupo. También son procesos estáticos y aunque pueden mostrar cierta variación estacional, no exhiben periodos de remisión y de rebrote que son típicos de otras alteraciones de la queratinización como por ejemplo la enfermedad de Darier.

## 1.2. HISTORIA DE LAS ICTIOSIS

La historia escrita de las ictiosis comienza en 1731, cuando el astrónomo inglés John Machin presentó en la Real Sociedad de Londres un paciente de catorce años, llamado Edward Lambert, que sufría un particular trastorno que él denominó “cuticular distemper”<sup>1,4</sup>. El

paciente sufría una forma muy severa de ictiosis hystrix. Había nacido de padres sanos y tuvo seis hijos afectos. La familia Lambert se ganaba la vida viajando a lo largo de Europa exponiéndose públicamente en distintas ferias. Eran conocidos como los hombres “porcupine” (puercoespín) (Fig. 1a). Probablemente para llamar más la atención se decía que solo los varones de la familia estaban afectados. Esta información falsa fue recogida en distintos artículos médicos de la época y en textos de genética humana en los que se consideró la prueba concluyente de la existencia de una forma de herencia ligada al cromosoma Y. No fue hasta 1958 cuando Penrose y Stern<sup>5</sup> pudieron corregir este mito. Basándose en un estudio exhaustivo del registro parroquial del pueblo de Suffolk, reconstruyeron el árbol genealógico de la familia Lambert y determinaron que el patrón de herencia era autosómico dominante. La naturaleza exacta de la ictiosis que padecía esta familia nunca se llegó a conocer, aunque en función de sus características clínicas probablemente se tratara de una ictiosis de Curth-Macklin. El interés que generaron en aquella época fue tal que, en 1808, uno de los primeros libros de dermatología, escrito por Robert Willan<sup>3</sup>, dedicaba un capítulo completo a la descripción de la familia Lambert e introducía el término ictiosis para referirse a ellos. Desde entonces, los avances en el campo de las ictiosis se sucedieron secuencialmente a lo largo de los siglos.

En el siglo XIX Alibert mencionó por primera vez la existencia de un patrón de herencia autosómico dominante en la ictiosis vulgar y se describió el primer caso de feto arlequín, una variedad letal de ictiosis congénita. Peukert *et al.*<sup>(citado por 1)</sup>, a finales de ese siglo, dio una definición estricta del término ictiosis enfatizando su carácter generalizado.

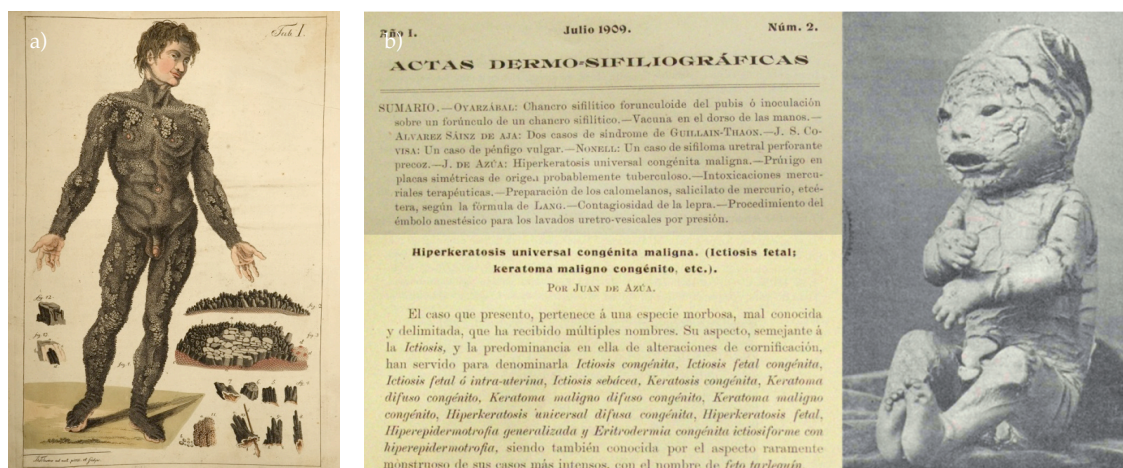


Figura 1. a) Hombre “porcupine” dibujado por Tilesius en 1802. b) Imágenes del primer artículo con fotografías de la revista Actas Dermo-Sifiliográficas. (Extraído de Díaz-Díaz *et al.*, 2009).

En el año 1900, Riecke separó la ictiosis laminar (IL) del feto arlequín. Propuso una clasificación de las ictiosis en función de su severidad. Distinguía tres subtipos: la ictiosis congénita I, que correspondía al feto arlequín; la ictiosis congénita II, que correspondía a la IL; y la ictiosis congénita III, que era una forma de inicio tardío, que probablemente se correspondía con la ictiosis recesiva ligada a X. Dos años más tarde, de forma independiente, Brocq introdujo el término “erythrodermie congénitale ichthyosiforme” para enfatizar el carácter eritrodérmico de las ictiosis congénitas y distinguió formas ampollosas y no ampollosas<sup>6</sup>. Posteriormente se identificó el patrón conocido como hiperqueratosis epidermolítica en la forma ampollosa de la enfermedad<sup>7</sup>. En 1904, se definieron los conceptos de hiperqueratosis de retención y de proliferación. Fue también en esta época, en el año 1909, cuando Juan de Azúa publicaba en *Actas Dermosifiliográficas* el primer caso clínico con ilustraciones de la revista, titulado “hiperqueratosis universal congénita maligna”, en el que se presentaba una ictiosis arlequín (IA) (Fig. 1b)<sup>8</sup>.

En 1929, Siemens introdujo el pensamiento genético en el campo de las ictiosis y fue capaz de demostrar que no podía existir una transición entre distintos tipos de ictiosis<sup>1</sup>. Rechazaba el término “ictiosis congénita tarda” acuñado por Riecke. Sin embargo, aceptaba la diferenciación entre las ictiosis congénitas I y II, aunque proponía llamarles “ichthyosis congénita gravis” e “ictiosis congénita mitis”. Fueron Frost y van Scott en 1960 los que emplearon el término IL para referirse a la ictiosis congénita mitis<sup>7,9</sup>. El propio Frost, en un trabajo posterior, reconocía que la IL tenía un espectro clínico amplio y que muchos pacientes exhibían solo pequeñas escamas blanquecinas y marcado eritema.

En el periodo desde 1930 a 1965 se describieron muchas variedades de ictiosis, como la enfermedad de Refsum, el síndrome de Sjögren-Larsson y el síndrome de Comèl-Netherton. A estos avances siguieron la caracterización ultraestructural de las ictiosis de Anton-Lamprecht y el redescubrimiento de la ictiosis recesiva ligada a X. En 1984 Traupe *et al.*<sup>10</sup> describieron un nuevo subtipo de IL con patrón de herencia autosómico dominante. Este hallazgo fue confirmado por Toribio *et al.*<sup>11</sup> en 1986.

En las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de los trastornos moleculares y genéticos que subyacen las distintas formas de ictiosis. En 1994 se identificaron las mutaciones en el gen *TGM1* como responsables de muchos casos de IL. Desde entonces se han identificado al menos cinco nuevos *loci* relacionados con las ictiosis congénitas autosómicas recesivas (ICAR): el *ABCA12*, el *ALOXE3*, el *ALOX12B*, el *CYP4F22* y el *NIPAL4*<sup>2</sup>.

### 1.3. CLASIFICACIÓN CLÍNICA ACTUAL DE LAS ICTIOSIS HEREDITARIAS

Durante años, existió gran confusión en la terminología y clasificación de las ictiosis, utilizándose distintos términos para definir las mismas entidades. En el año 2009, dermatólogos, dermatopatólogos y genetistas de distintos países se reunieron en la Conferencia de Consenso de Ictiosis, en Sorèze, Francia, y desarrollaron una nueva clasificación de las ictiosis, consistente con los conocimientos moleculares y fisiopatológicos actuales<sup>2</sup>. Esta clasificación está basada en la clínica y diferencia dos grandes formas de ictiosis: las formas no sindrómicas, en las que la expresión fenotípica del defecto genético subyacente se manifiesta exclusivamente en la piel; y las formas sindrómicas, en las que la enfermedad se presenta en la piel y a nivel de otros órganos.

#### 1.3.1. FORMAS NO SINDRÓMICAS DE ICTIOSIS

Dentro de las formas no sindrómicas se distinguen cuatro grupos (Tabla 1) (Fig. 2):

- **Ictiosis comunes.** Este grupo incluye aquellas ictiosis con alta prevalencia, como son la ictiosis vulgar y la ictiosis recesiva ligada a X, cuya prevalencia es de 1:250-1000 y 1:2000-6000 respectivamente<sup>12</sup>. La ictiosis recesiva ligada a X se considera sindrómica cuando se asocia a manifestaciones extracutáneas y no sindrómica cuando la ictiosis se presenta de forma aislada<sup>1</sup>.
- **ICAR.** Clásicamente, dentro de este grupo se diferenciaban la IL y la eritrodermia ictiosiforme congénita (EIC). En la nueva clasificación se incluye la ictiosis arlequín (IA) puesto que se ha visto que mutaciones funcionalmente inactivantes en el gen *ABCA12* causan esta enfermedad<sup>13,14</sup>, mientras que mutaciones *missense* en el mismo gen resultan en un fenotipo menos severo que se presenta como bebé colodión y más tarde evoluciona a IL<sup>15</sup> o EIC<sup>16,17</sup>. También se incluyen en este grupo otras variantes o subtipos de ICAR menos frecuentes, como el bebé colodión autorresolutivo (BCAR), el bebé colodión acral autorresolutivo (BCARA) y la ictiosis en traje de baño (ITB)<sup>18-20</sup>.

- **Ictiosis queratinopáticas.** Engloba las ictiosis causadas por mutaciones en los genes que codifican las queratinas. El término hiperqueratosis epidermolítica deriva de la observación, bajo microscopía óptica, de vacuolización intracelular, agrupamiento de tonofilamentos y formación de pequeñas ampollas intraepidérmicas en las ictiosis que resultan de mutaciones de las queratinas<sup>21</sup>. Este término se ha utilizado como sinónimo de ictiosis bullosa, eritrodermia ictiosiforme congénita ampollosa, ictiosis exfoliativa o ictiosis bullosa de Siemens. Sin embargo, los hallazgos microscópicos característicos no se presentan en todos los casos. Por ello, para sustituir la confusa nomenclatura previa, el término hiperqueratosis epidermolítica se restringiría para describir los hallazgos histopatológicos o ultraestructurales y se propone emplear el término general ictiosis queratinopáticas para referirse a las ictiosis que derivan de mutaciones en las queratinas.

Dentro de las ictiosis queratinopáticas se distinguen dos formas mayores: las ictiosis epidermolíticas y las ictiosis epidermolíticas superficiales. Las ictiosis epidermolíticas serían aquellas que presentan hiperqueratosis epidermolítica a nivel ultraestructural. La ictiosis epidermolítica superficial es el nombre propuesto para designar a la ictiosis bullosa de Siemens. En este grupo se incluyen también otras formas menores como la ictiosis epidermolítica anular<sup>22</sup>, la ictiosis de Curth-Macklin<sup>23</sup>, la ictiosis epidermolítica autosómica recesiva<sup>24</sup> y el nevus epidermolítico. En la ictiosis de Curth-Macklin, se ha propuesto omitir el adjetivo “hystrix”, ya que cambios de este tipo pueden verse en otras ictiosis como el síndrome KID o en algunas formas de displasia ectodérmica. La mayoría de las ictiosis queratinopáticas se transmiten de forma autosómica dominante. Sin embargo, se ha visto que mutaciones *nonsense* en el gen *KRT10* pueden causar una forma recesiva de ictiosis epidermolítica<sup>24</sup>. El nevus linear epidermolítico es una variante de nevus epidérmico que presenta histopatológicamente hiperqueratosis epidermolítica. Se incluye en este grupo porque puede representar un mosaicismo tipo 1 causado por mutaciones somáticas en los genes *KRT1* o *KRT10*, por lo que si la mutación afecta a las gónadas puede provocar en la descendencia una forma generalizada de ictiosis epidermolítica<sup>25,26</sup>.

- **Otras.** El cuarto grupo incluye formas poco frecuentes como la queratodermia lorícina o variante en camisa de la enfermedad de Vohwinkel<sup>27,28</sup>, la eritroqueratodermia variabilis<sup>29-31</sup>, el síndrome de la piel exfoliada<sup>32-35</sup>, la eritrodermia ictiosiforme reticular congénita<sup>36-38</sup> y la queratosis linear-ictiosis congenita-queratodermia (síndrome KCLICK)<sup>39-42</sup>.



Figura 2. Formas no sindrómicas de ictiosis. a) y b) Ictiosis vulgar. c) y d) Ictiosis recesiva ligada a X. e) Ictiosis epidermolítica. f) y g) Ictiosis epidermolítica superficial. h) Ictiosis epidermolítica lineal. i) Nevus epidermolítico. j) y k) Ictiosis de Curth-Macklin. l) y m) Queratodermia lorricrina. n) y ñ) Eritroqueratodermia variabilis. o) Eritrodermia ictiosiforme reticular congénita. p), q) y r) Síndrome KLICK. (Extraído de Oji *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2006; Kronic *et al.*, 2003; Renner *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2006).

### 1.3.2. FORMAS SINDRÓMICAS DE ICTIOSIS

Dentro de las formas sindrómicas se distinguen las formas ligadas a X y las autosómicas recesivas (Tabla 2) (Fig. 3):

- **Formas ligadas a X.** Son la ictiosis recesiva ligada a X en su forma sindrómica, el síndrome ictiosis folicular-atricia-fotofobia<sup>43-45</sup> y el síndrome de Conradi-Hünemann-Happle<sup>46,47</sup>.
- **Formas autosómicas.** Se subdividen en tres grupos según asocien:
  - › Trastornos del pelo. Incluye el síndrome de Netherton<sup>48,49</sup>, el síndrome ictiosis-hipotricosis<sup>50,51</sup>, el síndrome ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante<sup>52,53</sup> y la tricodistrofia<sup>54,55</sup>.
  - › Trastornos neurológicos. Engloba el síndrome de Sjögren-Larsson<sup>56-58</sup>, el síndrome de Refsum<sup>59</sup> y el síndrome MEDNIK (retraso mental-enteropatía-sordera-neuropatía-ictiosis-queratodermia)<sup>60,61</sup>.
  - › Curso fatal de la enfermedad. Incluye el síndrome de Gaucher tipo 2<sup>62</sup>, la deficiencia de sulfatasas múltiple<sup>63-65</sup>, el síndrome CEDNIK (disgenesia cerebral-neuropatía-ictiosis-queratodermia palmoplantar)<sup>66,67</sup> y el síndrome ARC (artrogriposis-disfunción renal-colestasis)<sup>68-70</sup>.
  - › Otros signos. Engloba el síndrome KID<sup>71-73</sup>, la enfermedad por almacenamiento de lípidos neutros con ictiosis<sup>74-76</sup> y el síndrome ictiosis prematuridad<sup>77-80</sup>.

Tabla 1. Ictiosis hereditarias no sindrómicas.

Enfermedad	Herencia	Gen(es)	Comienzo	Manifestaciones Iniciales	Manifestaciones Cutáneas
<b>Ictiosis comunes</b>					
Ictiosis vulgar	Autosómica semidominante	FLG	Infancia	Xerosis, descamación, prurito, eczema.	Descamación fina, blanca o grisácea, generalizada. Respeto fosas poplíteas y antecubitales. Hiperlinealidad palmoplantar. No eritema. Diátesis atópica.
Ictiosis recesiva ligada a X (no sindrómica)	Recesiva ligada a X	STS	Al nacimiento/ Infancia	Eritrodermia y/o descamación generalizada.	Escamas grandes, romboidales, oscuras, muy adheridas, generalizadas. Respeto cara, pliegues, palmas y plantás. Más severo en cuello. No eritema.
<b>ICAR</b>					
<b>Formas mayores</b>					
IA	AR	ABCA12	Al nacimiento	Membrana colodión severa.	Cuadro severo de IL o EIC.
IL	AR	TGM1/ALOX12B/ALOXE3/ NIPAL4/CYP4F22/ABCA12	Al nacimiento	Membrana colodión o EIC.	Más severas. Escamas grandes, oscuras, generalizadas. Ectropion. Alopecia cicatricial.
EIC	AR		Al nacimiento	EIC o membrana colodión.	Menos severas. Descamación fina generalizada con eritema.
<b>Formas menores</b>					
BCAR	AR	TGM1, ALOX12B, ALOXE3	Al nacimiento	Membrana colodión.	Resolución completa o casi completa en los primeros tres meses de vida.
BCARA	AR	TGM1	Al nacimiento	Membrana colodión acral.	Resolución completa o casi completa en los primeros tres meses de vida.
ITB	AR	TGM1	Al nacimiento	Membrana colodión.	Descamación tipo IL en tronco, axilas, cuero cabelludo (áreas de mayor temperatura).
<b>Ictiosis queratinopáticas</b>					
<b>Formas mayores</b>					
Ictiosis epidermolítica	AD	KRT1/KRT10	Al nacimiento	Eritrodermia, descamación leve, grandes erosiones.	Hiperqueratosis con patrón en empedrado (más prominente en articulaciones y zonas de fricción). Mal olor. Eritema. Ampollas tras traumatismos. Infecciones cutáneas. Prurito. KRT1: queratoderma palmoplantar epidermolítica. KRT10: no afectación palmoplantar.
Ictiosis epidermolítica superficial	AD	KRT2	Al nacimiento	Eritrodermia y ampollas.	Menos severo. Hiperqueratosis sobre articulaciones. No eritema. Áreas denudadas superficiales. Ampollas tras traumatismos. Prurito. No afectación palmoplantar.
<b>Formas menores</b>					
Ictiosis epidermolítica anular	AD	KRT1/KRT10	1 <sup>er</sup> año de vida	Descamación generalizada, ampollas.	Placas eritemato-descamativas, anulares o policíclicas, en tronco y extremidades. Curso intermitente.
Ictiosis de Curth-Macklin	AD	KRT1	Infancia	Queratoderma palmoplantar difusa o estriada.	Placas hiperqueratósicas en las articulaciones, tronco y extremidades. Posible eritrodermia. Queratoderma palmoplantar masiva. Bandas de constricción.
Ictiosis epidermolítica AR	AR	KRT10	Al nacimiento	Eritrodermia, descamación leve, grandes erosiones.	Hiperqueratosis con patrón en empedrado (sobre todo en articulaciones y zonas de fricción). Mal olor. Eritema. Ampollas tras traumatismos. Infecciones cutáneas. Prurito.
Nevus epidermolítico	Mutaciones somáticas	KRT1/KRT10	Al nacimiento/ infancia	Lesión queratósica marronácea de disposición lineal.	Lesión queratósica marronácea de disposición lineal.
<b>Otras formas</b>					
Queratoderma loricina	AD	LOR	Al nacimiento	EIC o membrana colodión.	Queratoderma palmoplantar difusa en panel de abeja, constricciones digitales. Descamación leve, fina, blanquecina, generalizada, con hiperqueratosis marcada en articulaciones.
Eritroqueratoderma variabilis	AD	G/B3/G/B4	Al nacimiento/ 1 <sup>er</sup> año de vida	Placas eritematosas migratorias transitorias y placas hiperqueratósicas generalizadas o de límites geográficos.	Placas eritematosas migratorias transitorias y placas hiperqueratósicas generalizadas o de límites geográficos. Queratoderma palmoplantar difusa (50%). Curso intermitente (hiperqueratosis más estable).
Síndrome de la piel exfoliada	AR	CDSN	Al nacimiento/ 1 <sup>ra</sup> semana de vida	EIC. Lesiones de tipo dermatitis atópica.	Descamación exfoliativa, blanquecina, generalizada. Eritema que mejora con la edad. Afectación palmoplantar. Prurito. Curso intermitente.
Eritrodermia ictiosiforme reticular congénita	AD?	KRT10	Al nacimiento	EIC exfoliativa. Afectación de grandes áreas con un patrón reticular.	Descamación fina, amarilla-marrón, generalizada, con patrón reticulado. Eritema marcado. Afectación palmoplantar.
Síndrome KLICK	AR	POMP	Al nacimiento	Ictiosis congénita.	Descamación blanquecina-marronácea, generalizada, con queratosis lineares en los pliegues. Queratoderma palmoplantar.

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; BCAR: bebé colodión autorresolutivo; BCARA: bebé colodión autorresolutivo acral; EIC: eritrodermia ictiosiforme congénita; ICAR: ictiosis congénita autosómica recesiva; IL: ictiosis laminar; ITB: ictiosis en traje de baño; KLICK: queratosis lineal-ictiosis congénita-queratoderma.

Tabla 2. Ictosis hereditarias sindrómicas.

Enfermedad	Herencia	Gen(es)	Manifestaciones Cutáneas	Manifestaciones Extracutáneas
<b>Ictosis sindrómica ligada a X</b>				
Ictosis recesiva ligada a X (forma sindrómica)	Recesiva ligada a X	<i>SFS</i>	Similar a la forma no sindrómica.	Criptorquidia. Opacidades corneales.
Ictosis foliular-atríquia-fotofobia (síndrome IFAP)	Recesiva ligada a X	<i>MBPTS2</i>	Descamación blanquecina con leve eritema. Queratosis foliular generalizada.	Fotofobia. Retraso psicomotor. Atríquia congénita.
Síndrome de Conradi-Hünermann-Happle (Condroadiplasia puntata 2)	Dominante ligada a X	<i>EBP</i>	EIC que evoluciona a hiperqueratosis lineal. Hiper o hipopigmentación estríada. Atrofodermia foliular.	Alteraciones óseas. Calcificaciones puntadas epifisarias, estatura corta, escoliosis, acortamiento de los miembros. Cataratas.
<b>Ictosis sindrómicas autosómicas</b>				
Trastornos del pelo				
Síndrome de Netherton	AR	<i>SPINK5</i>	Ictosis linear circunfleja.	Tricorexis invaginata. Diátesis atópica. Infecciones cutáneas frecuentes.
Síndrome IH	AR	<i>S714</i>	Descamación tipo IL. Hipohidrosis.	Hipotricosis. Atrofodermia foliular. Fotofobia y pingüecula.
Síndrome IHCE	AR	<i>CLDN1</i>	Ictosis de tipo vulgar.	Colangitis esclerosante. Hipotricosis. Alopecia cicatricial frontotemporal.
Tricotodistrofia	AR	<i>XPD, XPB, TTD1</i>	Ictosis de tipo vulgar.	Pelo quebradizo (aspecto de cebra). Fotosensibilidad. Retraso psicomotor. Estatura corta. Hipogonadismo. Cataratas. Infecciones recurrentes.
Trastornos neurológicos				
Síndrome de Sjögren-Larsson	AR	<i>ALDH3A2</i>	Descamación fina generalizada con eritema. Hipohidrosis.	Paraplejía espástica. Retraso mental. Alteraciones oculares.
Síndrome de Refsum	AR	<i>PHYH/PEX7</i>	Xerosis o descamación fina generalizada de comienzo tardío. No eritema.	Retinitis pigmentosa. Neuropatía periférica. Ataxia cerebelosa. Anosmia. Sordera progresiva. Arritmias cardíacas.
Síndrome MEDNIK	AR	<i>AP1S1</i>	Similar a la eritroqueratodermia variabilis.	Retraso mental. Diarrea crónica. Sordera neurosensorial congénita. Neuropatía periférica. Retraso psicomotor y de crecimiento.
Curso de la enfermedad letal				
Síndrome de Gaucher tipo 2	AR	<i>GBA</i>	EIC o bebé colodión leve. Descamación fina generalizada que puede resolverse tras el periodo neonatal. Hipohidrosis.	<i>Hydrops fetalis</i> : Deterioro neurológico. Hepatoesplenomegalia. Hipotonía. Distrés respiratorio. Artritis. Anomalías faciales. Muerte sobre los dos años de edad.
Déficit múltiple de sulfatasas	AR	<i>SUMF1</i>	Similar a ictosis recesiva ligada a X.	Leucodistrofia metacromática. Mucopolisacaridosis. Condroadiplasia puntata recesiva ligada a X. Deterioro psicomotor. Muerte en el primer año de vida (forma neonatal severa).
Síndrome CEDNIK	AR	<i>SNAP29</i>	Comienzo tardío (5-11 meses). Descamación tipo IL, respetando pliegues. Queratodermia palmoplantar	Disgenesia cerebral. Neuropatía. Microcefalia. Atrofia muscular neurogénica. Atrofia nervio óptico. Dismorfia facial. Retraso psicomotor. Sordera neurosensorial. Muerte en la primera década.
Síndrome ARC	AR	<i>IP333B</i>	Descamación generalizada fina o laminar, sin eritema, respetando los pliegues. Ectropion.	Artritis. Colestasis con hipoplasia de ductos biliares intrahepáticos. Disfunción tubular renal. Diabetes insípida nefrogénica. Diarrea. Anomalías plaquetarias. Dismorfismo facial. Malformaciones cerebrales. Muerte en el primer año de vida.
Otros signos asociados				
Síndrome KID	AD	<i>GJB2 (GJB6)</i>	Eritroqueratodermia generalizada o localizada. Hiperqueratosis puntiforme. Queratodermia palmoplantar difusa.	Sordera neurosensorial. Queratitis. Fotofobia. Malformaciones cerebrales. Hipotricosis. Triada de oclusión foliular. Infecciones. Carcinoma espinocelular.
Síndrome de Chanarin-Dorfman (Enfermedad por almacenamiento de lípidos neutros)	AR	<i>ABHD5 (CG1-58)</i>	Similar a EIC. Eritroqueratodermia variabilis. Membrana colodión.	Esteatosis hepática con hepatomegalia. Miopatía. Vacuolas lipídicas en neutrófilos. Menos frecuente: retraso mental y del desarrollo, sordera, cardiomiopatía, cataratas.
Síndrome ictosis-prematurnidad	AR	<i>SC12744</i>	Al nacimiento descamación gruesa de tipo caseoso. Luego xerosis, hiperqueratosis foliular y descamación fina.	Prematuridad. Polihidramnios. Asfixia al nacimiento potencialmente letal. Diátesis atópica. Eosinofilia. Ocasional IgE elevada.

AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; ARC: artritis-disfunción renal-colestasis; CEDNIK: disgenesia cerebral-neuropatía-ictosis-queratodermia; EIC: eritrodermia ictosiforme congénita; IH: ictosis-hipotricosis; IHCE: ictosis-hipotricosis-colangitis esclerosante; IL: ictosis laminar; MEDNIK: retraso mental-enteropatía-sordera-neuropatía-ictosis-queratodermia.



Figura 3. Formas sindrómicas de ictiosis. Características clínicas del síndrome de Netherton: ictiosis linear circunfleja (a), pelo frágil y quebradizo (b), tricorrexis invaginata (c). Síndrome ictiosis hipotricosis: atrofodermia folicular (d), hipotricosis (e). Tricotiodistrofia: coiloniquia y descamación periungueal (f) pelo con imagen en cebra (g). Síndrome de Chanarin-Dorfman: ictiosis (h), vacuolas lipídicas en neutrófilos (i). (Extraído de Sun *et al.*, 2006; Alef *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010; Emre *et al.*, 2010).

## 1.4. ETIOPATOGENIA DE LAS ICTIOSIS HEREDITARIAS

### 1.4.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA CUTÁNEA

La función más importante de la piel es actuar como barrera entre el interior y el exterior del organismo (Fig. 4). La capa córnea limita el acceso de irritantes y alérgenos exógenos y regula la pérdida transepidérmica de agua. La queratinización es el proceso de diferenciación de los queratinocitos desde la capa basal al estrato córneo. La consecuencia final de este proceso es la aparición de los corneocitos, que contienen únicamente filamentos de queratina y la matriz proteica que los agrega y que carecen de núcleo y organelas. La capa córnea tiene tres componentes principales: los filamentos de queratina y la matriz proteica que rellenan los corneocitos, la envoltura cornificada de la periferia celular y las capas de lípidos intercelulares. La mayoría de las ictiosis muestran alteraciones relacionadas con uno u otro componente del estrato córneo<sup>81-83</sup>.

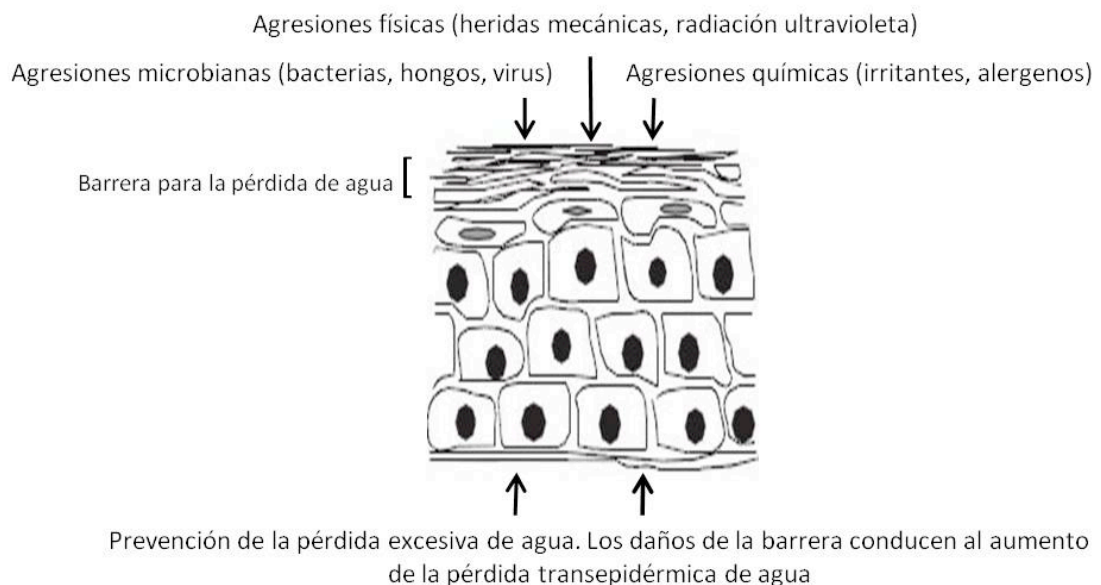


Figura 4. Funciones de la barrera epidérmica. (Adaptado de Proksch *et al.*, 2008).

## - Corneocitos

Las queratinas son las principales proteínas estructurales de los queratinocitos. En función de sus propiedades bioquímicas, se clasifican en queratinas tipo 1 o ácidas, que se codifican en el cromosoma 17, y queratinas tipo 2 o básicas, que se codifican en el cromosoma 12<sup>84</sup>. Se expresan como heterodímeros obligados, de forma que los filamentos intermedios de queratina están formados por una queratina de cada tipo. Estas parejas de queratinas forman una red que rodea el núcleo de la célula y se extiende a través del citoplasma para terminar en los desmosomas y hemidesmosomas constituyendo de este modo el citoesqueleto de los queratinocitos<sup>85</sup>.

El tipo de queratinas varía en función de la localización y del grado de diferenciación celular (Fig. 5). En los queratinocitos basales predominan el par de queratinas 5 (K5) y 14 (K14), y a medida que estos avanzan hacia la capa espinosa, empiezan a expresar las queratinas 1 (K1) y 10 (K10) y en menor medida la queratina 2 (K2), que van reemplazando progresivamente a las anteriores<sup>86</sup>. En localizaciones especiales se expresan cantidades significativas de otras queratinas: por ejemplo en palmas y plantas la K1 se une a la queratina 9 (K9), y las queratinas 6, 16 y 17 se expresan, además de en las palmas y plantas, en la matriz ungueal, en el folículo piloso y en las glándulas sebáceas y sudoríparas<sup>87</sup>.

La matriz proteica del corneocito está formada por diversas proteínas, de las cuales la filagrina es el principal componente. La función principal de la filagrina es agregar los filamentos de queratina en haces condensados paralelos, llevando al colapso de la célula y a la forma aplanada que caracteriza a los corneocitos. La filagrina se sintetiza en la capa granulosa a partir de su precursor profilagrina, que se almacena en los gránulos de queratohialina<sup>88</sup> y es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 1 (1q21) en una región denominada complejo de diferenciación epidérmica<sup>89</sup>.

La filagrina y las queratinas constituyen el 80-90% de la masa proteica de la epidermis de los mamíferos<sup>90,91</sup>. En la matriz proteica existen otras proteínas como la involucrina y las proteínas ricas en prolina, que además forman parte de la envoltura cornificada.

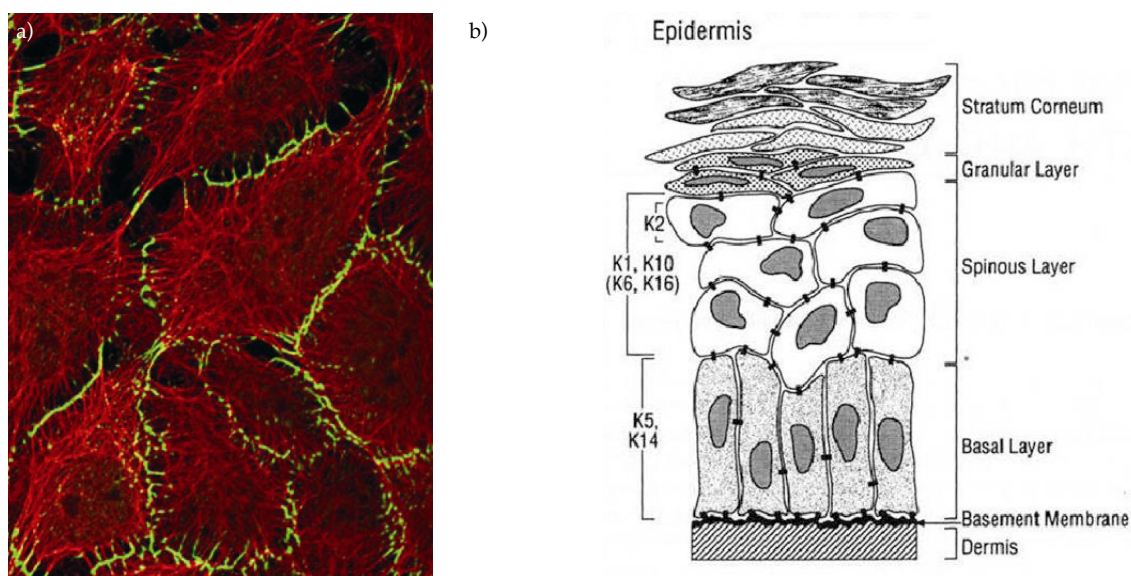


Figura 5. a) Filamentos de queratina que conforman el citoesqueleto de la célula. (Extraído de Moll *et al.*, 2008). b) Distribución de las distintas queratinas en las capas de la epidermis. (Extraído de Presland *et al.*, 2000)

### - Envoltura cornificada

Es una estructura polimérica proteico-lipídica que se sitúa en la cara interna de la membrana celular limitando el exterior de los corneocitos. Consta de dos partes: la envuelta proteica y la envuelta lipídica<sup>83</sup>.

La envuelta proteica está formada por proteínas insolubles unidas covalentemente gracias a las enzimas transglutaminasas (TGAsas) epidérmicas (Fig. 6). Las TGasa 1, TGasa 3 y TGasa 5 participan en la formación de enlaces isopeptídicos entre diferentes proteínas estructurales como son la involucrina, la loricrina, la desmoplaquina, la envoplaquina, la periplaquina, la cistatina A y las proteínas ricas en prolina<sup>92,93</sup>. Estos puentes isopeptídicos son resistentes a las enzimas proteolíticas más frecuentes. La catepsina D está implicada en la activación de la TGasa 1 al producir el clivaje de su precursor de 150 kDa a la forma activa de 35 kDa<sup>94</sup>. La loricrina y la involucrina son los principales componentes de la envoltura cornificada y son codificadas por genes que se localizan, al igual que el de la filagrina, en el cromosoma 1 (1q21)<sup>89</sup>. Las proteínas de la envoltura cornificada constituyen el 7-10% de la masa proteica de la epidermis.

La envuelta lipídica se sitúa por fuera de la envuelta proteica. Es una estructura similar a la membrana plasmática que reemplaza a ésta en el exterior del corneocito. Está formada fundamentalmente por  $\omega$ -hidroxiceramidas que se mantienen unidas a la

involucrina, la envoplaquina y la periplaquina de la envuelta proteica a través de enlaces covalentes en cuya formación participa la enzima TGasa<sup>190,95</sup>. Esta enzima interviene también en la unión de los filamentos de queratina y de la filagrina a la envoltura cornificada.

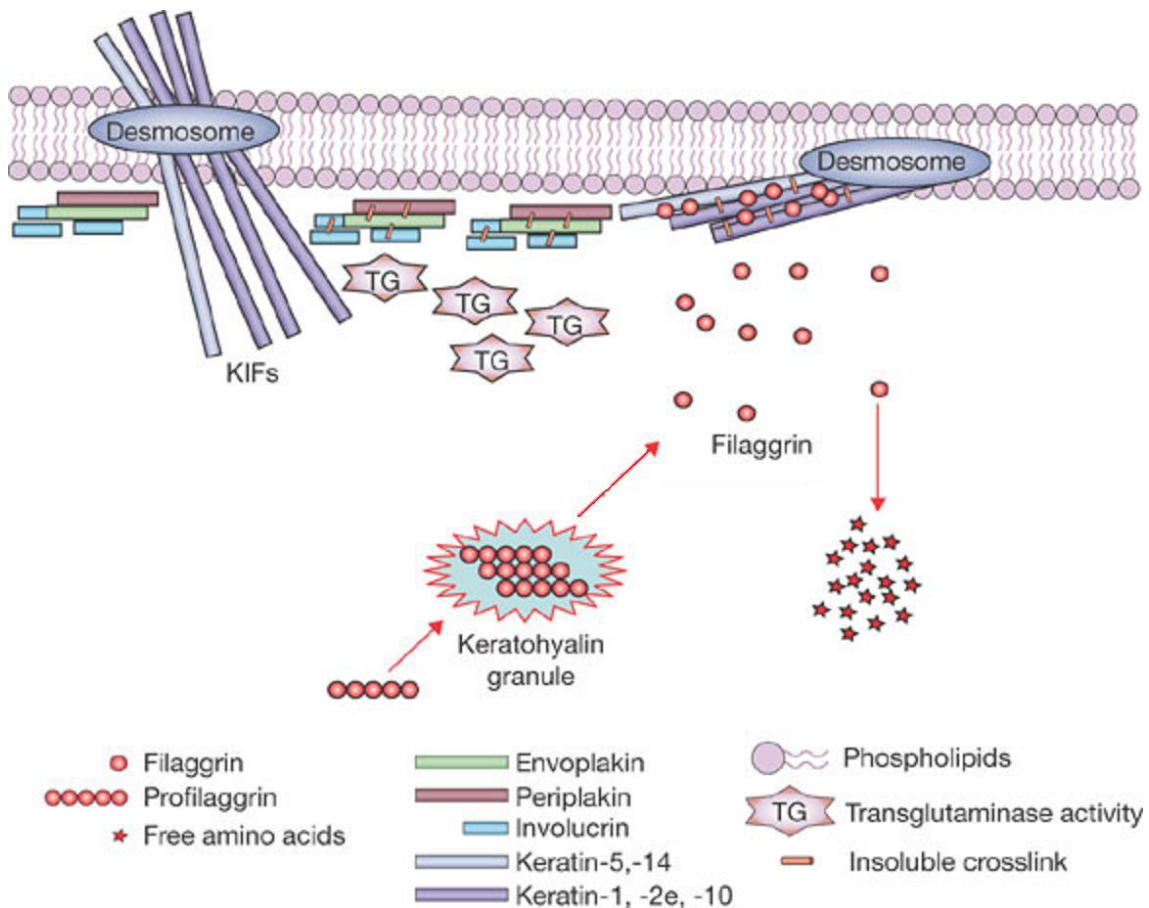


Figura 6. Esquema de la formación de la envoltura cornificada. (Extraído de Nicotera y Melino, 2007).

### - Lípidos intercelulares

La composición lipídica de la epidermis cambia de manera sustancial durante la queratinización<sup>96</sup>. En la parte alta del estrato espinoso y en la capa granulosa, aparecen los cuerpos lamelares, cuerpos de Odland o queratinosomas<sup>97</sup>. Estas vesículas se originan en el aparato de Golgi y contienen lípidos polares, glucoesfingolípidos, colesterol, fosfolípidos, diversas enzimas catabólicas y  $\beta$ -defensina 2 humana. En respuesta a ciertas señales, como el incremento en la concentración de calcio, los cuerpos lamelares se mueven hacia la parte alta de la capa granulosa y secretan su contenido al espacio intercelular por un mecanismo de exocitosis. Los lípidos secretados son modificados y

dispuestos de forma lamelar, paralelos a la superficie de la célula. Para ello, la envuelta lipídica de la envoltura cornificada actúa como soporte. En el espacio intercelular, los lípidos polares son transformados enzimáticamente en productos no polares. La hidrólisis de los glucoesfingolípidos genera ceramidas y los fosfolípidos se transforman en ácidos grasos libres. En estas modificaciones participan enzimas como la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (implicada en la enfermedad de Gaucher), la esfingomielinasa ácida y la fosfolipasa A2. Los principales componentes lipídicos del espacio intercelular son las ceramidas, los ácidos grasos libres y el colesterol<sup>98</sup>. La enzima sulfatasa esteroidea, que también se secreta desde los cuerpos lamelares al espacio intercelular, participa en el procesamiento de los lípidos, generando colesterol libre a partir del colesterol sulfato. Se ha visto que el colesterol sulfato inhibe las proteasas que están implicadas en la descamación del estrato córneo. Por ello, el descenso de los niveles de colesterol sulfato provocado por la acción de la sulfatasa esteroidea permite la degradación de los corneodesmosomas y la descamación normal de la epidemis<sup>99</sup>.

#### **- Otros**

Las células epidérmicas se comunican entre sí por medio de los desmosomas, los puentes de unión intercelulares o “gap junctions” y las uniones estrechas o “tigh junctions”.

La función principal de los desmosomas es mantener la unión entre las células, aunque también participan en procesos de señalización celular. Están compuestos por placoglobina, placofilina, desmoplaquina y cadherinas (desmocolina y desmogleína) que actúan como anclaje para los filamentos intermedios de queratina del interior de la célula<sup>85</sup>. En la transición entre las capas granulosa y córnea, la morfología de los desmosomas sufre importantes cambios al integrarse en la envoltura cornificada. La cohesión de los corneocitos depende de estos desmosomas modificados, conocidos como corneodesmosomas. Uno de los componentes de esta nueva estructura es la corneodesmosina.

Los puentes de unión intercelular están formados por proteínas de membrana llamadas conexinas, que se agrupan en bloques de seis formando estructuras canaliculares que se unen con estructuras similares de las células vecinas. Permiten el transporte de agua, iones y pequeñas moléculas (<1kDa)<sup>30</sup>.

Las uniones estrechas son zonas de unión entre las membranas de células vecinas que forman una barrera impermeable. Están compuestas por varias proteínas transmembrana, siendo las principales las claudinas. Además de mantener unidas las células, participan en la función barrera de la piel y permiten el paso selectivo de ciertas sustancias<sup>100,101</sup>.

Las proteasas también intervienen en la diferenciación epidérmica mediante el procesamiento de los precursores de la envuelta cornificada, la eliminación del núcleo y las mitocondrias de los queratinocitos y la degradación de los corneodesmosomas<sup>94</sup>.

#### 1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ICTIOSIS EN FUNCIÓN DEL DEFECTO SUBYACENTE EN EL PROCESO DE CORNIFICACIÓN

##### 1.4.2.1. DEFECTOS EN PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL CORNEOCITO

- **Filamentos intermedios de queratina.** Los defectos en las queratinas producen el debilitamiento y colapso del citoesqueleto de la célula y la disminución de la estabilidad mecánica de la epidermis.
  - › K1 y K10. La ictiosis epidermolítica<sup>102</sup>, su variante anular<sup>103,104</sup> y el nevus epidérmico epidermolítico<sup>25,26</sup> están causados por mutaciones en los genes *KRT1* y *KRT10*, que codifican las K1 y K10 respectivamente. La ictiosis de Curth-Macklin se debe a mutaciones en el gen *KRT1*<sup>105,106</sup> y la ictiosis epidermolítica autosómica recesiva está causada por mutaciones *nonsense* en el gen *KRT10*<sup>24</sup>.
  - › K2. Las mutaciones en el gen *KRT2* son responsables de la ictiosis epidermolítica superficial o ictiosis bullosa de Siemens<sup>107,108</sup>. La K2 se expresa más tarde que las K1 y K10, cuando el queratinocito se acerca a la capa granulosa. Por ello, la alteración de los filamentos de K2 se limita a las capas más altas de la epidermis resultando en unas manifestaciones clínicas menos severas.
- **Filagrina.** Mutaciones en el gen de la filagrina (*FLG*) han sido detectadas en pacientes con ictiosis vulgar<sup>109</sup>. Los pacientes con ictiosis vulgar con frecuencia desarrollan dermatitis atópica y a su vez, los pacientes con dermatitis atópica con frecuencia presentan

descamación cutánea. Las mutaciones en el gen *FLG* podrían ser factores predisponentes para el desarrollo de dermatitis atópica<sup>110,111</sup>.

#### 1.4.2.2. DEFECTOS EN LA ENVOLTURA CORNIFICADA

- **TGasas epidérmicas.** Mutaciones en el gen *TGM1* que codifica la enzima TGasa 1 son responsables de un porcentaje importante de ICAR<sup>112,113</sup>. La pérdida de función de esta enzima altera la formación de enlaces cruzados entre las proteínas que forman la envoltura cornificada. Puesto que la enzima TGasa 1 participa también en la formación de puentes cruzados entre las hidroxiceramidas y la envoltura cornificada, las mutaciones que afecten a su función alteran secundariamente la barrera lipídica. Las mutaciones en el gen *TGM5* que codifica la TGasa 5 se asocian al síndrome de piel exfoliada acral<sup>33,114</sup>.
  
- **Proteínas estructurales de la envoltura cornificada.** La variante Camisa de la enfermedad de Vohwinkel, que se denomina también queratodermia lorícina<sup>28,115</sup>, y la eritroqueratodermia simétrica progresiva<sup>116</sup> se han relacionado con defectos en la lorícina. El mecanismo patogénico subyacente no se conoce.

#### 1.4.2.3. DEFECTOS EN LOS LÍPIDOS INTERCELULARES

##### - Defectos en la síntesis y modificación de los lípidos.

- › Enzima sulfatasa esteroidea. Defectos en el gen *STS*, que codifica esta enzima, son responsables de la ictiosis recesiva ligada a X. Las alteraciones de esta enzima actúan por un doble mecanismo. Por un lado impiden la formación de colesterol libre alterando la barrera lipídica. Por otro, la acumulación de colesterol sulfato en el espacio intercelular inhibe la descamación, resultando en la retención de corneocitos<sup>117</sup>.
  
- › Vía de las hepxilinas (Fig. 7). Aunque el papel exacto de los productos de la vía de las hepxilinas no se conoce, se ha especulado que puedan contribuir a la formación de las capas de lípidos intercelulares o que actúen como señales para promover la diferenciación de los queratinocitos.

En esta vía, el ácido araquidónico es transformado en un producto epoxialcohol (hepoxilina) específico por la acción secuencial de dos lipoxigenasas (LOX) epidérmicas: la 12R-LOX y la eLOX-3<sup>118</sup>. El producto hepoxilina derivado de ambas enzimas es inestable y es hidrolizado en las células a un derivado trihidroxi específico (trioxilina).

Las mutaciones en el gen *NIPAL4*, antes conocido como *ICHTHYIN*, que codifica una probable proteína de membrana, se han asociado a un fenotipo similar al causado por los defectos de las LOX. Por ello, Lefèvre *et al.*<sup>119</sup> especularon que esta proteína puede ser un receptor de las hepoxilinas, de las trioxilinas o de otros metabolitos de la misma vía. Estos metabolitos podrían actuar no solo a través de este receptor, sino también a través de la activación de receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR) que podrían ser importantes reguladores de la diferenciación epidérmica<sup>120</sup>.

Otro gen implicado en la vía de las hepoxilinas sería el *CYP4F22*, que codifica un miembro no caracterizado de la familia CYP4. Las enzimas de esta familia actúan generalmente como ω-hidroxilasas. Se ha especulado que el producto del *CYP4F22* podría estar implicado en la producción del producto final activo de la vía de las LOX<sup>121</sup>.

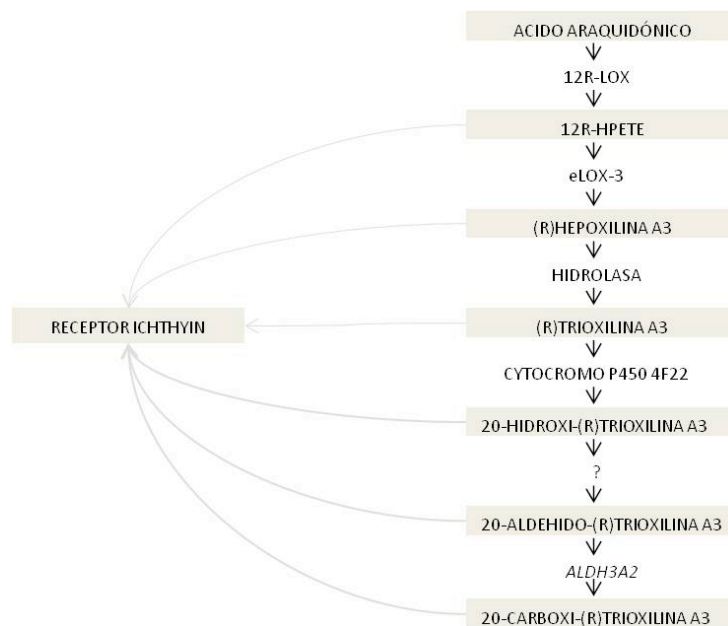


Figura 7. Vía de las hepoxilinas.

- » 12R-LOX y eLOX-3. Mutaciones en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3*, que codifican estas enzimas, han sido identificadas en algunos pacientes con ICAR. Estas enzimas transforman el ácido araquidónico en heptoxilina A3 que es inestable y se hidroliza a trioxilina A3 en las células<sup>122</sup>.
  - » Citocromo P450, familia 4, subfamilia F, homólogo del polipéptido 2 (*CYP4F22*). Este citocromo es codificado por el gen *CYP4F22*. Mutaciones en este gen han sido detectadas en pacientes con ICAR. Participa en la hidroxilación de la trioxilina A3 a 20-hidroxi-(R)-trioxilina A3<sup>121</sup>.
  - » Ichthyin. Mutaciones en el gen *ichthyin* o *NIPAL4* son responsables de algunos casos de IL y EIC. Se ha sugerido que pudieran codificar un receptor de membrana para ligandos como la trioxilina A3<sup>119</sup>.
- › *Transporte de ácidos grasos*. El gen *SLC27A4* está mutado en los pacientes con síndrome de ictiosis prematuridad. Codifica la proteína transportadora de ácidos grasos FTAP4 que es necesaria para la activación y el transporte de los ácidos grasos hacia el interior de la célula y juega un importante papel para mantener la homeostasis de los lípidos en el estrato córneo<sup>80</sup>.
- **Transporte y secreción de lípidos**. Mutaciones en el gen *ABCA12*, que codifica para una proteína transportadora de membrana, han sido identificadas en pacientes con IA y en algunos casos de IL y EIC. El defecto de esta proteína conlleva la alteración del transporte de lípidos a través de los gránulos lamelares y la ausencia de las capas de lípidos intercelulares de la capa córnea<sup>14</sup>.
  - **Síntesis y homeostasis del colesterol**. El síndrome CHILD está causado por mutaciones en el gen *NSDHL*, que codifica la enzima 3β-hidroxiesteroide-dehidrogenasa que interviene en la síntesis de colesterol<sup>123</sup>. El síndrome de Conradi-Hünemann-Happle está causado por mutaciones en el gen *EBP*, que codifica la proteína de membrana EBP que tienen actividad Δ8-Δ7-esterol-isomerasa<sup>46</sup>. El síndrome IFAP está causado por el defecto en una metaloproteína intramembrana de zinc, codificada por el gen *MBTPS2*, implicada en la homeostasis del colesterol<sup>45</sup>.

- **Metabolismo de los triglicéridos.** El síndrome de Chanarin-Dorfman está causado por mutaciones en el gen *CGI-58* (o *ABHD5*). El producto de este gen es un cofactor necesario para la lipólisis en cooperación con la lipasa de los triglicéridos<sup>124</sup>. Al alterarse la degradación de los lípidos, gotas de triglicéridos se acumulan en diversos órganos como el hígado, los músculos y los neutrófilos<sup>125</sup>. A nivel de la piel, el exceso de triglicéridos altera la barrera cutánea<sup>74</sup>.
- **Enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa.** Esta enzima cataliza la hidrólisis de glucosilceramidas a ceramidas. Las ceramidas son un componente crítico de los lípidos intercelulares en la capa córnea. En la enfermedad de Gaucher tipo 2, causada por mutaciones en el gen *GBA*, la enzima es defectuosa y las glucosilceramidas se acumulan en las células causando daño esplénico, hepático, óseo y del sistema nervioso central. En las formas severas de la enfermedad los pacientes presentan descamación cutánea. Algunos estudios indican que los cambios cutáneos pueden deberse a la formación inadecuada de las lamelas de lípidos en la capa córnea.
- **Hidroxilación peroxisomal.** La enfermedad de Refsum se caracteriza por el exceso de ácido fitánico en diversos tejidos por una alteración de su metabolismo a nivel de los peroxisomas. El ácido fitánico acumulado reemplaza a los ácidos grasos normales. Este trastorno se debe a mutaciones en la enzima fitanol-CoA hidroxilasa codificada por el gen *PHYH* o en una proteína receptora de la matriz peroxisomal que permite la importación de proteínas como la fitanol-coA hidroxilasa al interior del peroxisoma y es codificada por el gen *PEX7*<sup>126</sup>.
- **Enzima deshidrogenasa de aldehídos grasos.** El síndrome de Sjögren-Larsson se debe a defectos en esta enzima debido a mutaciones en el gen *ALDH3A2*. Se asocia a alteraciones en la formación y secreción de los cuerpos lamelares<sup>127</sup>.
- **Mecanismos regulatorios del tráfico de vesículas.** En el síndrome CEDNIK, se han identificado mutaciones en el gen *SNAP29* que codifica una proteína SNARE implicada en la fusión de vesículas. La expresión de esta proteína está disminuida en la piel de los pacientes, alterando la maduración y secreción de los cuerpos lamelares que son retenidos en el interior de los corneocitos y conllevando la alteración de la disposición de los lípidos epidérmicos y de las proteasas<sup>66</sup>. En los síndromes MEDNIK y ARC, las mutaciones en los genes *AP1S1* y *VPS33B* también alteran el tráfico vesicular<sup>61,68</sup>.

#### 1.4.2.4. OTROS DEFECTOS

- **Proteasas.** El síndrome de Netherton está causado por mutaciones en el gen *SPINK5*, que codifica un inhibidor de la serina proteasa LEKTI que específicamente interacciona con la calicreína 5 y 7 y probablemente con otras proteasas<sup>48</sup>. El síndrome ictiosis-hipotricosis se debe a mutaciones en el gen *ST14*. Este gen codifica la matriptasa, una enzima de la familia de las serín proteasas que se sintetiza en los queratinocitos diferenciados y en las células corticales y matriciales del pelo<sup>50</sup>.
  
- **Reparación y transcripción del ADN.** La tricotiodistrofia asociada a ictiosis está causada por mutaciones en los genes *XPD*, *XPB* y *TTDA* que determinan un defecto en el sistema de reparación del ADN<sup>128,129</sup>.
  
- **Defectos en las uniones intercelulares.**
  - › Corneodesmosomas. Mutaciones en el gen *CDSN*, que codifica la corneodesmosina, son responsables del síndrome de la piel exfoliada<sup>34,35</sup>.
  
  - › “Gap junctions”. La eritroqueratodermia variabilis está producida por mutaciones en los genes *GJB3* y *GJB4* que codifican las conexinas 31 y 30.3 respectivamente<sup>30</sup>. El síndrome KID está causado por mutaciones en el gen *GJB2* que codifica la conexina 26. Esta conexina se expresa en epitelios de origen ectodérmico del oído interno, de la córnea y de la epidermis, lo cual explica el espectro de manifestaciones clínicas que vemos en este síndrome<sup>72</sup>. De forma aislada se han descrito mutaciones en el gen *GJB6*, que codifica la conexina 30, en un paciente con síndrome KID y atriquia congénita<sup>71</sup>.
  
  - › “Tight junctions”. El síndrome ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante se debe a mutaciones en el gen *CLDN1* que codifican la claudina<sup>130</sup>.

Tabla 3. Clasificación de las ictiosis según el defecto en la cornificación.

Defecto	Proteína (gen)	Trastorno
<b>Proteínas estructurales del corneocito</b>		
Filamentos intermedios de queratina	K1 y K10 ( <i>KRT1/KRT10</i> )	Ictiosis epidermolítica, ictiosis epidermolítica anular, nevus epidérmico epidermolítico
	K1 ( <i>KRT1</i> )	Ictiosis de Curth-Macklin
	K2 ( <i>KRT2</i> )	Ictiosis epidermolítica superficial
Gránulos de queratohialina	Filagrina ( <i>FLG</i> )	Ictiosis vulgar
<b>Envoltura cornificada</b>		
TGasas epidérmicas	TGasa 1 ( <i>TGM1</i> ) TGasa 5 ( <i>TGM5</i> )	IL, EIC, BCAR, BCARA, ITB Síndrome de la piel exfoliada acral
Proteínas estructurales	Loricrina ( <i>LOR</i> )	Queratoderma loricrina
<b>Defectos en los lípidos intercelulares</b>		
Síntesis o modificación de lípidos:		
- Defecto vía de las hepoxilinas	12R-LOX ( <i>ALOX12B</i> )	IL/EIC/BCAR
	eLOX-3 ( <i>ALOXE3</i> )	IL/EIC/BCAR
	Citocromo P450 4F22 ( <i>CYP4F22/FLJ39501</i> )	IL/EIC
	Ictina ( <i>ICHTHYIN/NIPAL4</i> )	IL/EIC
- Déficit de sulfatasa esteroidea	Sulfatasa esteroidea ( <i>STS</i> )	Ictiosis recesiva ligada a X
- Defecto en el transporte de AG	FTAP4 ( <i>SLC27A4</i> )	Síndrome ictiosis prematuridad
Transporte y secreción de lípidos	Cassette ligador de ATP ( <i>ABCA12</i> )	IA, IL, EIC
	3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa ( <i>NSDHL</i> )	Síndrome CHILD
Síntesis y homeostasis del colesterol	Δ <sub>8</sub> ,Δ <sub>7</sub> -esterol isomerasa ( <i>EBP</i> )	Síndrome Conradi-Hünemann-Happle
	Metaloproteína intramembrana de zinc ( <i>MBTPS2</i> )	Síndrome IFAP
Metabolismo de los triglicéridos	Cofactor de la lipasa ácida ( <i>ABHD5/CGI-58</i> )	Síndrome Chanarin-Dorfman
Almacenamiento lisosomal	β-glucocerebrosidasa ( <i>GBA</i> )	Enfermedad de Gaucher tipo 2
Hidroxilación peroxisomal	Fitanol-CoA hidroxilasa ( <i>PHYH/PEX7</i> )	Enfermedad de Refsum
Oxidación microsomal	Deshidrogenasa de aldehídos grasos ( <i>ALDH3A2</i> )	Síndrome de Sjögren-Larsson
	Proteína SNARE ( <i>SNAP29</i> )	Síndrome CEDNIK
Mecanismos regulatorios del tráfico de vesículas	Complejo AP-1 ( <i>AP1S1</i> )	Síndrome MEDNIK
	Proteínas Sec1/Munc18-like ( <i>VPS33B</i> )	Síndrome ARC
<b>Otros defectos</b>		
Proteasas	Serina-proteasa LEKTI ( <i>SPINK5</i> )	Síndrome de Netherton
	Matriptasa ( <i>ST14</i> )	Síndrome IH
Reparación y transcripción del ADN	( <i>XPD, XPB, TTDA</i> )	Tricotiodistrofia asociada a ictiosis
Uniones intercelulares:		
- Corneodesmosomas	Corneodesmosina ( <i>CDSN</i> )	Síndrome de la piel exfoliada
- "Gap junctions"	Conexinas 31 y 30.3 ( <i>GJB3/GJB4</i> )	Eritroqueratoderma variabilis
	Conexina 26 ( <i>GJB/GJB6</i> )	Síndrome KID
- "Tight junctions"	Claudina ( <i>CLDN1</i> )	Síndrome IHCE

AG: ácidos grasos; ARC: artrogriposis-disfunción renal-colestasis; BCAR: bebé colodión autorresolutivo; BCARA: bebé colodión autorresolutivo acral; Complejo AP-1: complejo adaptador de proteínas; EIC: eritrodermia ictiosiforme congénita; FTAP4: proteína de transporte de ácidos grasos 4; IA: ictiosis arlequín; IFAP: ictiosis folicular-atríquica-fotofobia; IH: ictiosis-hipotricosis; IHCE: ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante; IL: ictiosis laminar; ITB: ictiosis en traje de baño; LOX: lipoxigenasas; TGasa: transglutaminasa.

## 1.5. ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS

Las ICAR son trastornos de la queratinización infrecuentes que se engloban dentro de las ictiosis hereditarias no sindrómicas. Existen pocos datos sobre su epidemiología. En Estados Unidos se ha estimado una prevalencia de 1:100.000 para la IL y 1:200.000 para la EIC. Otros estudios han calculado una prevalencia conjunta para IL y EIC de 1:200.000-300.000<sup>131,132</sup>. En Noruega, la prevalencia es mayor (1:91.000) debido a la existencia de mutaciones fundadoras<sup>133</sup>. 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 diez años (trabajo pendiente de publicación).

Clásicamente, en el grupo de las ICAR se distinguían únicamente dos trastornos: la IL y la EIC. En la nueva clasificación de consenso del 2009<sup>2</sup>, se añadió a este grupo la IA, puesto que se ha visto que mutaciones inactivantes en el gen *ABCA12* causan esta entidad<sup>13,14</sup> mientras que mutaciones *missense* en el mismo gen pueden dar lugar a un fenotipo de IL<sup>15</sup> o EIC<sup>16,17</sup>. Otras variantes menos frecuentes también incluidas son el BCAR, el BCARA y la ITB<sup>18-20</sup>.

Aunque durante muchos años se pensó que la IL se transmitía únicamente de manera autosómica recesiva, en 1984 Traupe *et al.*<sup>10</sup> describieron la existencia de una variedad de IL autosómica dominante. Este hallazgo fue confirmado dos años más tarde por Toribio *et al.*<sup>11</sup>. El defecto genético subyacente de la IL dominante todavía no se conoce. Los hallazgos clínicos e histopatológicos no son específicos pero la ultraestructura, que muestra un incremento importante de la zona de transición entre las capas granulosa y córnea, nos permite diferenciarlo de otras formas de ictiosis<sup>134</sup>.

### 1.5.1. ICTIOSIS LAMINAR Y ERITRODERMIA ICTIOSIFORME CONGÉNITA

#### 1.5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los pacientes con IL tienen un cuadro clínico más severo que los pacientes con EIC. La mayoría de ellos nacen envueltos en una membrana colodión. Esta membrana desaparece

progresivamente en las primeras semanas de vida y es reemplazada por escamas laminares grandes y habitualmente oscuras que ocupan toda la superficie corporal. No presentan eritrodermia o ésta es mínima. La tensión de la piel de la cara produce ectropion, que dificulta el cierre palpebral y favorece la aparición de conjuntivitis y queratitis. También puede haber eclabium e hipoplasia de los cartílagos auriculares y nasales. Pueden presentar alopecia cicatricial, especialmente en la periferia del cuero cabelludo, y queratodermia palmoplantar. Es frecuente que tengan hipohidrosis, intolerancia severa al calor y distrofia ungueal con engrosamiento y estriaciones de las láminas ungueales. Las escamas pueden acumularse en el conducto auditivo llevando a la oclusión del mismo, con el consiguiente riesgo de colonización bacteriana e infecciones óticas recurrentes<sup>135-137</sup>.

La EIC es un cuadro menos severo, caracterizado por la presencia de eritrodermia y descamación fina blanquecina generalizada. Los pacientes también nacen habitualmente como bebés colodión. La severidad del cuadro es variable. Algunos pacientes presentan marcado eritema y escamas generalizadas que pueden ser grandes y oscuras, sobre todo en las superficies extensoras de las piernas. También pueden asociar ectropion y alopecia cicatricial. En los casos menos severos el eritema es leve y la descamación fina y generalizada. Las palmas y plantas con frecuencia presentan queratodermia difusa. La obstrucción de los ductos sudoríparos puede dar lugar a hipohidrosis e intolerancia al calor. También pueden presentar distrofia ungueal<sup>135-137</sup>.

Aunque originariamente se pensó que la IL y la EIC eran distintas entidades, se ha visto que existen pacientes con manifestaciones clínicas intermedias y que ambas condiciones pueden ser causadas por mutaciones en el mismo gen<sup>138,139</sup>. Además, pacientes con la misma mutación, incluso dentro de una misma familia, pueden desarrollar distintos fenotipos<sup>133,138</sup>.

#### 1.5.1.2. HISTOPATOLOGÍA

Los cambios histopatológicos no son diagnósticos. En la IL se observa hiperqueratosis ortoqueratósica masiva, habitualmente dos veces mayor que en la EIC. La epidermis es acantósica y en ocasiones presenta un patrón psoriasiforme. La tasa de proliferación celular es normal o está ligeramente elevada<sup>135-137</sup>.

Los pacientes con EIC presentan hiperqueratosis menos marcada, con paraqueratosis focal o extensa, granulosa normal o aumentada y acantosis más pronunciada. En las zonas de

paraqueratois la granulosa está disminuida. La tasa de renovación epidérmica está aumentada debido a la hiperproliferación de los queratinocitos basales<sup>135-137</sup>.

### 1.5.1.3. ULTRAESTRUCTURA

En función de los hallazgos ultraestructurales se han descrito cuatro tipos de ictiosis congénitas, sin que hasta la fecha se haya establecido una estricta correlación entre la ultraestructura, la clínica y la genética.

#### - Ictiosis congénita tipo 1

Se caracteriza por la ausencia de marcadores ultraestructurales de las ictiosis tipo 2, 3 y 4 y por ello el diagnóstico de este tipo de ictiosis solo puede hacerse tras excluir previamente los demás. El hallazgo ultraestructural más frecuente es la presencia de gotas o anillos lipídicos en la capa córnea (Fig. 8a)<sup>140</sup>. Estas gotas lipídicas no son constantes ni específicas del grupo, pues no todos los pacientes las presentan<sup>140</sup> y pueden verse en otros tipos de ictiosis<sup>141,142</sup>. Su presencia o número tampoco son criterios útiles para diferenciar las ictiosis tipo 1 y 2. Aunque suelen ser más numerosas en las ictiosis tipo 1, también pueden aparecer en elevado número en las tipo 2.

Otros hallazgos menos frecuentes son la presencia de gránulos de queratohialina de pequeño tamaño, cuerpos de Odland vesiculosos o lobulados y estructuras membranosas irregulares y pequeñas en algunos corneocitos<sup>140</sup>. Clínicamente, la mayoría de los pacientes presentan descamación fina generalizada y un grado variable de eritrodermia, compatible con una EIC. El grado de severidad es muy heterogéneo<sup>133,140</sup>.

Un tercio de los pacientes con ictiosis tipo 1 presentan mutaciones en el gen *TGM1*<sup>139</sup>. También se ha identificado la presencia de gotas lipídicas en el estrato córneo de pacientes con EIC y BCAR con mutaciones en el gen *ALOX12B*<sup>143,144</sup>. Uno de ellos presentaba además una secreción anormal del contenido de los cuerpos de Odland hacia el espacio intercelular a nivel de la capa granulosa<sup>144</sup>.

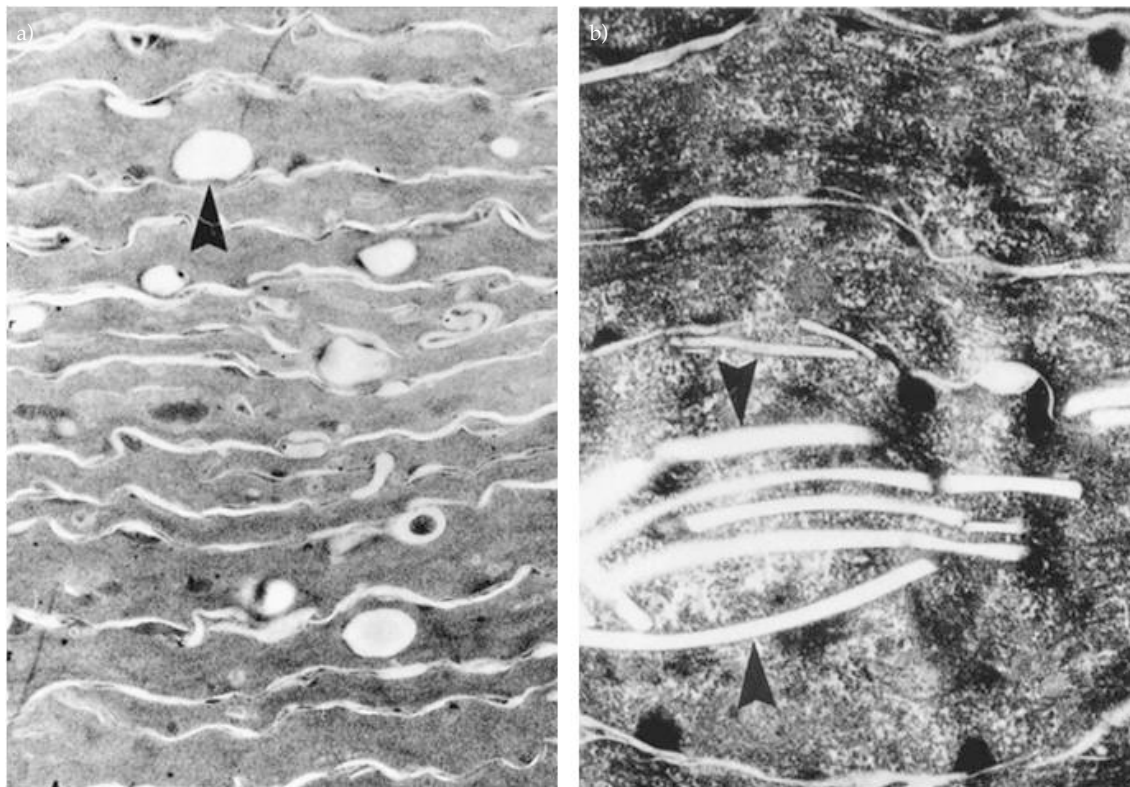


Figura 8. Hallazgos ultraestructurales de los distintos tipos de ictiosis (puntas de flecha). a) Ictiosis tipo 1: gotas lipídicas en los corneocitos. b) Ictiosis tipo 2: cristales de colesterol en la capa córnea. (Adaptada de Laiho *et al.*, 1999).

### - Ictiosis congénita tipo 2

Es el grupo de ictiosis congénitas más claramente definido. El diagnóstico se basa en la presencia de cristales de colesterol en la capa córnea<sup>141</sup>. Estos cristales son estructuras alargada y electrolucetas que se sitúan paralelas al eje mayor de los corneocitos (Fig. 8b). Es frecuente que se agrupen y pueden fusionarse ocupando la mayor parte de la célula. Están presentes en la mayoría de las secciones de microscopía electrónica pero no en todas, por ello, en ocasiones hay que examinar varios cortes para encontrarlas. Son una estructura constante de la enfermedad, ya que se detectan en distintas biopsias en un mismo paciente y no se modifican con el tratamiento con retinoides orales<sup>145</sup>. Otras alteraciones que se observan en la mayoría de pacientes son gránulos de queratohialina de pequeño tamaño y ausencia o adelgazamiento de la banda marginal o envoltura cornificada. También es frecuente la existencia de gotas lipídicas numerosas en la capa córnea y aisladas en el estrato de Malpighio y en los queratinocitos basales. Clínicamente, los pacientes presentan un cuadro de IL severa, con escamas grandes y oscuras y marcado ectropion<sup>133</sup>.

Este tipo ultraestructural se asocia de forma marcada a las mutaciones en el gen *TGM1*. En un estudio genético y ultraestructural de 38 familias con ICAR se clasificaron quince de ellas como ictiosis tipo 1 y ocho como ictiosis tipo 2 y se identificaron mutaciones en el gen *TGM1* en trece. Ocho familias con mutaciones en el *TGM1* fueron clasificadas como ictiosis tipo 2, y cinco como ictiosis tipo 1<sup>139</sup>. A su vez, todos los pacientes con ictiosis tipo 2 presentaban mutaciones en el gen *TGM1*, mientras que solo se identificaron en cinco de los pacientes con ictiosis tipo 1<sup>139</sup>. Resultados similares se encontraron en el estudio de 43 pacientes con ICAR de Noruega, donde se vio que la misma mutación fundadora se asociaba a ictiosis tipo 1 y 2 y el 89% de los pacientes con ictiosis tipo 2 presentaban mutaciones en el *TGM1*<sup>133</sup>. En otro estudio el 57% de los pacientes con mutaciones en el *TGM1* presentaban un patrón tipo 2 y el 37% un patrón tipo 1<sup>146</sup>.

En algunos pacientes con déficit en la actividad de la enzima TGasa 1 se observa, además de la pérdida de la envoltura cornificada, la existencia de agregados electrodensos en la periferia de los corneocitos (Fig. 9)<sup>147,148</sup>. En ratones *knockout* para la TGasa 1 se identificaron estructuras similares que se teñían con anticuerpos para loricrina. Este hallazgo llevó a especular que el origen de los agregados podría ser la alteración del transporte de loricrina hacia la membrana plasmática y de la formación de uniones cruzadas entre estas proteínas causada por el déficit de la enzima<sup>149</sup>.

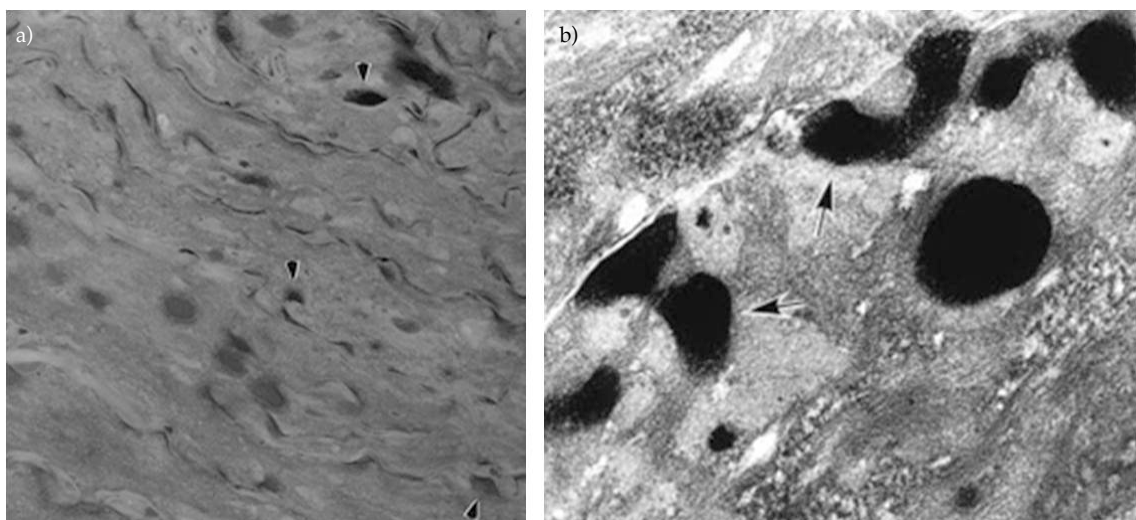


Figura 9. Estructuras electrodensas irregulares en la periferia de los corneocitos (flechas). a) Paciente con IL y déficit de TGasa 1. (Extraída de Yotsumoto *et al.*, 2000). b) Ratones *knockout* para TGasa 1. (Extraído de Matsuki *et al.*, 1998).

### - Ictiosis congénita tipo 3

El hallazgo ultraestructural característico es la presencia de estructuras membranosas laminadas a nivel de las capas granulosa y/o córnea (Fig. 10a). Habitualmente se disponen a modo de bandas que bordean un espacio vacío cercano al núcleo. Ocasionalmente pueden disponerse de forma concéntrica.

Otras alteraciones menos frecuentes son las anomalías de los cuerpos de Odland y la presencia de gotas lipídicas y complejos vesiculares. La banda marginal es normal<sup>142,150</sup>. En algunos pacientes se ha descrito la existencia de focos de vacuolas yuxtánucleares prominentes entremezcladas con restos celulares a nivel de la granulosa<sup>151,152</sup>. El cuadro clínico que caracteriza a estos pacientes difiere del resto. El comienzo de la ictiosis es variable. La descamación y el eritema pueden ser parcheados o generalizados y las flexuras están especialmente afectadas.

Recientemente, se ha visto que las mutaciones en el gen *NIPAL4* son responsables del 93% de las ictiosis tipo 3<sup>153</sup>. En dos de 23 pacientes con ictiosis tipo 3 no se detectaron mutaciones en este gen, lo que puede ser debido a que existan pero no se haya identificado o a la existencia de heterogenicidad genética. También se han detectado mutaciones en este gen en pacientes con otros hallazgos ultraestructurales<sup>153</sup>.

### - Ictiosis congénita tipo 4

De forma característica algunas de las células de las capas granulosa y córnea están repletas de paquetes de estructuras membranosas trilaminares (Fig. 10b)<sup>154</sup>. La envoltura cornificada en estos pacientes suele ser normal pero los cuerpos de Odland pueden presentar anomalías. Estos hallazgos son patognomónicos del síndrome de ictiosis prematuridad. Este síndrome es un trastorno autosómico recesivo muy infrecuente en todos los países excepto en Suecia, donde su frecuencia es mayor debido a la existencia de una mutación fundadora<sup>78</sup>. El curso de la enfermedad puede ser letal en el periodo neonatal debido a un síndrome de distrés respiratorio. Más tarde, el cuadro clínico es leve y se caracteriza por la presencia de marcada hiperqueratosis folicular que da a la piel un aspecto rugoso<sup>77</sup>.

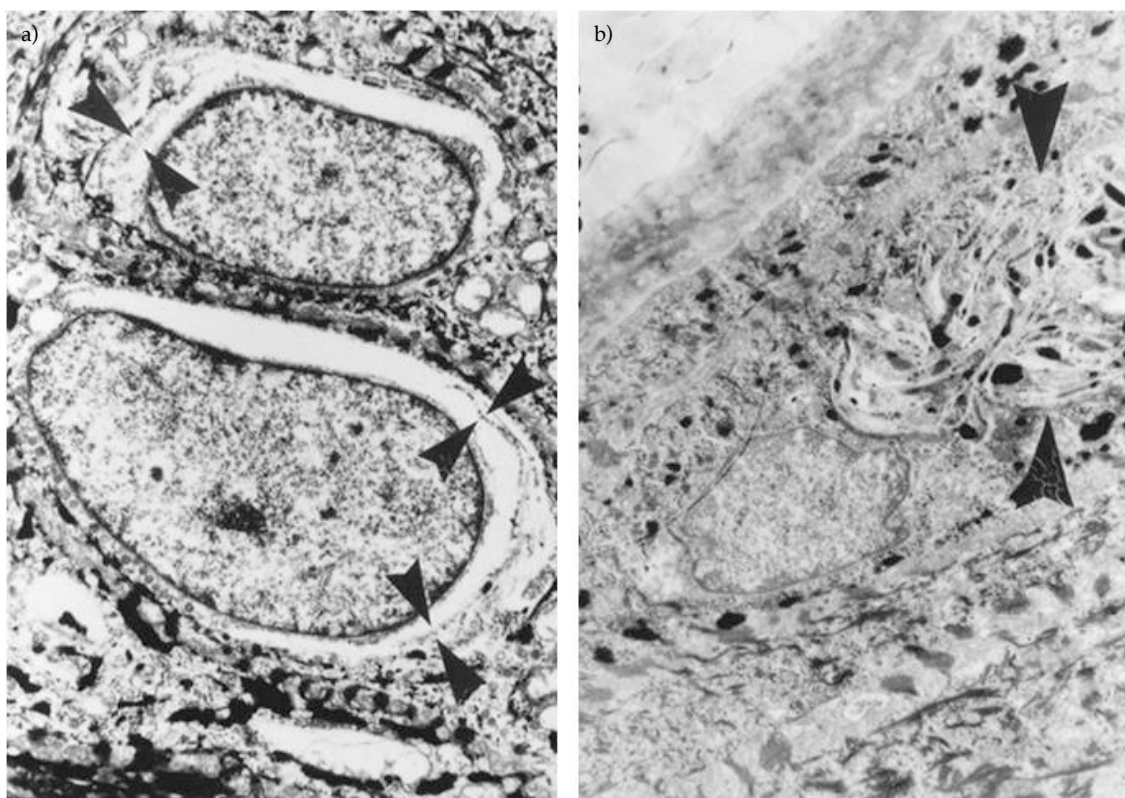


Figura 10. Hallazgos ultraestructurales de los distintos tipos de ictiosis (puntas de flecha). a) Ictiosis tipo 3: estructuras membranosas elongadas perinucleares. b) Ictiosis tipo 4: paquetes de estructuras membranosas. (Adaptada de Laiho *et al.*, 1999).

#### 1.5.1.4. ESTUDIOS MOLECULARES

Las ICAR son genéticamente heterogéneas. Hasta la fecha se han descrito mutaciones en seis genes: el *TGM1*, el *ALOX12B*, el *ALOXE3*, el *NIPAL4*, el *CYP4F22* y el *ABCA12* (Fig. 11). A pesar de esa heterogeneidad, el gen *TGM1* es el responsable de la mayoría de los casos, y por ello, debe ser el primero en analizarse. Fischer *et al.*<sup>113</sup>, estudiando 520 familias con ICAR identificaron mutaciones en alguno de estos genes en el 78% de ellas. Estas mutaciones se distribuían de la siguiente manera: 32% en el *TGM1*, 16% en el *NIPAL4*, 12% en el *ALOX12B*, 8% en el *CYP4F22*, 5% en el *ALOXE3* y 5% en el *ABCA12*. En otro estudio de 250 pacientes con ICAR de distintos orígenes, el 38% de ellos presentaban mutaciones en el gen *TGM1*, el 6,8% en el *ALOXE3* y el 6,8% en el *ALOX12B*<sup>155</sup>.

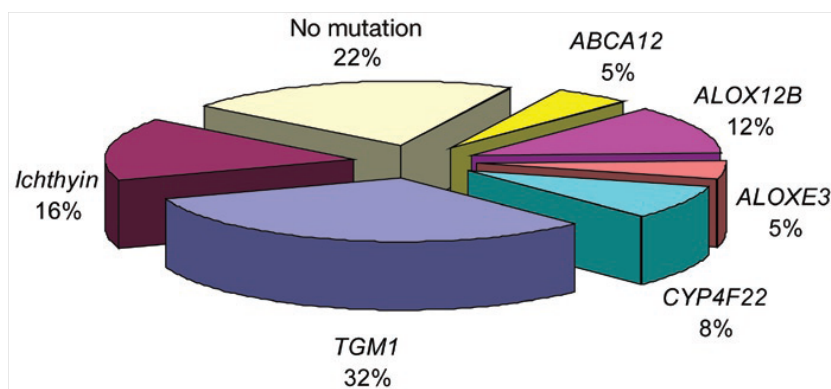


Figura 11. Distribución de las mutaciones en pacientes con ICAR. (Extraído de Fischer *et al.*, 2009).

#### 1.5.1.4.1. *TGM1*

El gen *TGM1* está situado en el cromosoma 14q11.2 (Fig. 12). Tiene 14.095 pares de bases, de los cuales 2454 son codificantes y se reparten en quince exones. En la TGasa 1 se distinguen cinco dominios proteicos: el dominio de anclaje, el  $\beta$ -sandwich, el *catalytic core*, donde se sitúa la triada catalítica con los tres sitios activos, el  $\beta$ -barrel 1 y el  $\beta$ -barrel 2. En el año 1995 se identificaron mutaciones en ambas copias de este gen como responsables de las ICAR<sup>112,156,157</sup>. Desde entonces se han descrito más de 110 mutaciones en pacientes con ICAR de diversos orígenes.

**Mecanismo.** El *TGM1* codifica la enzima TGasa 1, que es una de las ocho TGasas identificadas en humanos y una de las tres TGasas que se encuentran en la epidermis<sup>158</sup>. Esta enzima participa en la formación de la envoltura cornificada catalizando las uniones cruzadas, dependientes de calcio, de diversas proteínas como la involucrina, la loricrina y las proteínas ricas en prolina<sup>92,159</sup>. También cataliza la unión cruzada de las  $\omega$ -hidroxiceramidas de la capa externa de la envoltura cornificada con las proteínas de su capa interna<sup>83,90</sup>. En los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* la envoltura cornificada falta y la actividad de la enzima TGasa 1 está disminuida<sup>160-164</sup>.

**Mutaciones descritas.** Las mutaciones en el gen *TGM1* son la causa más común de ICAR<sup>113,155</sup>. En Estados Unidos son responsables del 55% de los casos y en Noruega del 84%<sup>133,165</sup>. Se han identificado mutaciones en todos los exones del gen, pero el 85% de ellas se sitúan en los dos primeros tercios del mismo. El exón 3 es el más frecuentemente afectado, con el 14% de mutaciones, y es seguido por los exones 8 y 7 con el 12 y 11% de mutaciones respectivamente<sup>166</sup>.

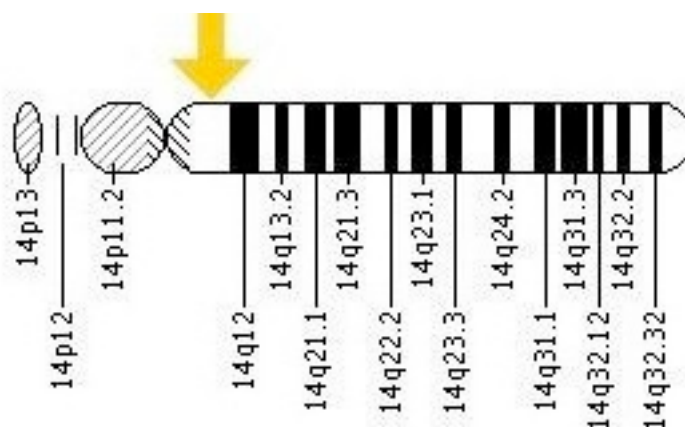


Figura 12. Localización del gen *TGM1* en el cromosoma 14.

La mutación más frecuente es la *splice-site*  $c.877-2A>G$ , que ha sido encontrada en el 34% de los alelos mutados descritos hasta la fecha<sup>166</sup>. Esta mutación fue inicialmente descrita en un paciente suízo con IL<sup>112</sup>. En Noruega, se detectó en el 80% de los alelos mutados en pacientes con IL y EIC<sup>133</sup> y en Norteamérica también fue la mutación más frecuente, identificándose en un 28% de los alelos alterados<sup>165</sup>. Se ha demostrado que la alta frecuencia de esta mutación en estos países se debe a un efecto fundador<sup>133,167</sup>. Se ha hipotetizado que esta mutación se originó en Westfalia, una región en el norte de Alemania, y que la emigración de las familias alemanas la introdujo en las poblaciones noruega (año 1000-1100 dC), finlandesa y norteamericana, y probablemente también en Egipto e Italia<sup>138,160,161,168-170</sup>.

La segunda mutación más frecuente se localiza en el exón 3 (p.Arg142His). Ésta y otras mutaciones similares han sido descritas en países como Egipto, Alemania y Estados Unidos<sup>112,138,157,165,168,171,172</sup>. En Finlandia la mutación p.Arg142Cys es la más frecuente en pacientes con ICAR y puesto que no se detectó un haplotipo común parece más probable que se trate de un *hotspot*<sup>173</sup>.

La mutación p.Arg307Trp es frecuente en la población japonesa debido a un efecto fundador<sup>16</sup>.

**Correlación genotipo-fenotipo.** Las mutaciones en el gen *TGM1* son responsables de la mayoría de los casos de IL<sup>138,148,161,163,169,172,174-177</sup> y de un pequeño porcentaje de pacientes con EIC<sup>160,164,178,179</sup>. También se ha visto que los pacientes con mutaciones en este gen pueden desarrollar otras formas de ICAR, como el BCAR y la ITB. Muchos estudios han intentado

mostrar asociaciones genotipo-fenotipo entre las mutaciones detectadas y los hallazgos ultraestructurales o la clínica<sup>138,139,167</sup> sin que hasta la fecha exista una correlación estricta.

En general los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* están más severamente afectados que los que no las tienen. Un estudio reciente de 104 pacientes con ICAR de los Estados Unidos, mostró que la existencia de mutaciones en este gen se asocia de forma significativa al uso de retinoides sistémicos y a la presencia de membrana colodión al nacimiento, ectropion, alopecia y escamas de tipo laminar<sup>165</sup>. En los pacientes sin mutaciones en el gen *TGM1* se observó una frecuencia ligeramente mayor de eritema, pero sin alcanzar significación estadística. Un estudio previo de 83 pacientes con ICAR de Suecia y Estonia también mostró una asociación entre la presencia de ectropion y membrana colodión y las mutaciones en el gen *TGM1*, y una frecuencia de eritema mayor en pacientes sin mutaciones en ese gen<sup>146</sup>. Además, se ha visto que las mutaciones truncantes se asocian más frecuentemente a hipohidrosis y alteraciones de la sudoración que las mutaciones *missense*<sup>165</sup>.

En la población norteamericana, se ha desarrollado un modelo para predecir la probabilidad de tener mutaciones en el gen *TGM1* en pacientes con ICAR: pacientes que nacen con una membrana colodión y que presentan problemas oculares y/o alopecia tienen cuatro veces más probabilidad de presentar mutaciones<sup>165</sup>.

Aunque se ha especulado que las mutaciones en el extremo C-terminal del gen *TGM1*, a nivel de los dominios  $\beta$ -barrel 1 y  $\beta$ -barrel 2, pudieran dar lugar a fenotipos menos severos de EIC<sup>178,179</sup>, algunos trabajos han demostrado que las mutaciones a ese nivel también se asocian a cuadros severos de IL<sup>147</sup>.

#### 1.5.1.4.2. *ALOXE3* Y *ALOX12B*

Los genes *ALOXE3* y *ALOX12B*, que codifican las LOX epidérmicas eLOX-3 y 12R-LOX, se sitúan en el cromosoma 17p13.1 (Fig. 13)<sup>180</sup>. Tienen 22.642 y 15.068pb respectivamente y una estructura similar formada por quince exones. Están separados por un intervalo intergénico de 38kb y guardan una importante homología en su secuencia. A nivel proteico se distinguen dos dominios: el *catalytic core*, donde se encuentran los cuatro residuos catalíticos, y el  $\beta$ -barrel.

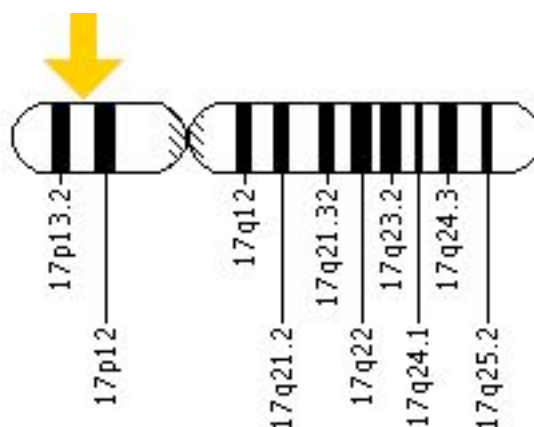


Figura 13. Localización de los genes *ALOXE3* y *ALOX12B* en el cromosoma 17.

**Mecanismo.** Las LOX son una familia de enzimas dioxigenasas que catalizan la oxigenación de los ácidos grasos a sus correspondientes derivados hidroperóxidos. Existen seis LOX en el genoma humano. La mejor conocida es la 5-LOX de los leucocitos, que da lugar a los leucotrienos, mediadores inflamatorios que aumentan la permeabilidad vascular y favorecen el edema. La 15S-LOX-2, la 12R-LOX y la eLOX-3, constituyen la subclase de LOX de tipo epidérmico. Son específicas de las células epiteliales y se sintetizan preferentemente en la piel y en menor medida en otros tejidos epiteliales<sup>118,181</sup>. Dos de las LOX epidérmicas, la 12R-LOX y la eLOX-3, se expresan predominantemente en las capas suprabasales de la epidermis, lo que apoya su papel en las fases avanzadas de la diferenciación epidérmica<sup>182</sup>. La 12R-LOX y la eLOX-3 tienen unas características enzimáticas y estructurales únicas. Ambas contienen un dominio extra localizado en la superficie de la subunidad catalítica<sup>183</sup>. La 12R-LOX es la única LOX que genera ácidos grasos hidroperóxidos con R-quiralidad y la eLOX-3 no tiene actividad dioxigenasa sino que actúan como una isomerasa hidroperóxido convirtiendo el producto de la 12R-LOX, un ácido 12R-hidroxi-eicosatetraenoico, en un isómero epoxialcohol que pertenece a la familia de la hepoxilina  $A_3$ <sup>181,184,185</sup>. 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. Un estudio de microscopía electrónica en un paciente con EIC y mutaciones en el *ALOX12B* evidenció la presencia de gotas lipídicas en el estrato córneo y la alteración de la secreción del contenido de los cuerpos de Odland hacia el espacio intercelular<sup>129,144</sup>. En un modelo murino también se han observado alteraciones de los lípidos intercelulares<sup>186</sup>. Por ello, se ha sugerido que los defectos en la vía de las LOX pudieran alterar el procesamiento de los cuerpos lamelares<sup>144</sup>.

**Mutaciones descritas.** Las mutaciones en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* se identificaron por primera vez en 2002<sup>187,188</sup>. Desde entonces se han descrito más de 30 mutaciones en el gen *ALOX12B*<sup>143,144,155,189-191</sup> y nueve en el gen *ALOXE3*<sup>155,188,189</sup>. Son responsables del 14-17% de las ICAR<sup>113,155</sup> y del 72,2% de los BCAR<sup>143,192,193</sup>. 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<sup>122,189</sup> y al reproducirse en modelos murinos un fenotipo ictiosiforme que remeda claramente al humano<sup>186,194,195</sup>. Ambos genes son responsables de un porcentaje similar de casos de ICAR. Sin embargo, pocas mutaciones diferentes se han identificado en el gen *ALOXE3* debido a la alta frecuencia de dos mutaciones, la p.Arg234X y la p.Pro630Leu, que han sido detectadas en quince familias de distintos orígenes geográficos y parecen representar *hotspots*<sup>155,188,189</sup>. En el gen *ALOX12B* algunas mutaciones se repiten en los exones 9 y 12, aunque ninguna de ellas se ha encontrado en más de cuatro cromosomas.

**Correlación genotipo-fenotipo.** A diferencia de los pacientes con déficit de TGasa 1 que presentan un fenotipo severo de IL con escamas grandes y oscuras, los pacientes con mutaciones en los genes *ALOXE3* y *ALOX12B* presentan habitualmente un cuadro clínico de EIC<sup>188,189,191</sup>. La descamación es leve o moderada y de color blanquecino o marrón claro y pueden asociar eritema. Hasta el 76% de los pacientes nacen como bebés colodión y el 88% presentan alteraciones en la sudoración<sup>155</sup>. Los hallazgos clínicos son independientes de la posición y del tipo de mutación, pero parece existir alguna diferencia entre los pacientes con mutaciones en uno u otro gen. Los pacientes con mutaciones en el gen *ALOX12B* muestran una descamación más discreta y blanquecina en comparación con los portadores de mutaciones en el gen *ALOXE3* que tienen escamas marronáceas y adherentes. La presencia de eritema se asociaba significativamente a defectos en el *ALOX12B*. Llamativamente, todos los pacientes con mutaciones en el *ALOX12B* presentaban hiperqueratosis palmoplantar y acentuación de los pliegues palmoplantares. Por el contrario, solo tres de los pacientes con mutaciones en el *ALOXE3* presentaban discreta queratosis palmar o plantar<sup>155</sup>.

#### 1.5.1.4.3. *ICHTHYIN/NIPAL4*

El gen *NIPAL4*, también conocido como *ichthyin*, está localizado en el cromosoma 5q33 (Fig. 14). Tiene 14.703pb. Las regiones codificantes se distribuyen en seis exones que codifican una proteína con varios dominios transmembrana<sup>119</sup>. La implicación de este gen en la etiopatogenia de las ICAR es reciente, data de 2004<sup>119</sup>.

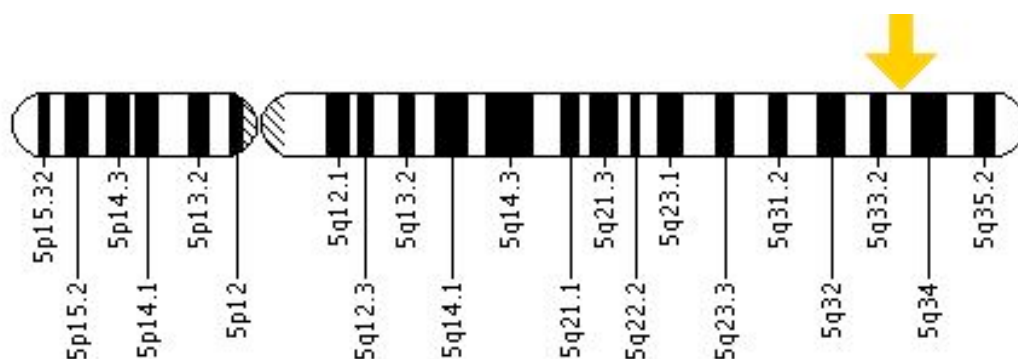


Figura 14. Localización del gen *NIPAL4* en el cromosoma 5.

**Mecanismo.** Aunque la función de este gen no se conoce, se ha hipotetizado que su producto proteico participe en la misma vía metabólica que las LOX. Podría actuar como receptor para la trioxilinas A3 y B3 o para otros metabolitos de la vía metabólica de las hepxilinas<sup>119</sup>. Los hallazgos ultraestructurales sugieren que el producto proteico del gen puede estar implicado en la formación de los cuerpos lamelares o en su transporte hacia el espacio extracelular<sup>153</sup>. A favor de este supuesto destacan dos hechos. En primer lugar, las mutaciones en este gen se asocian en un 93% de los casos a un patrón ultraestructural de ictiosis congénita tipo 3, caracterizado por las anomalías en los cuerpos lamelares y por la presencia de membranas perinucleares elongadas a nivel de la granulosa<sup>153</sup>. En segundo lugar, se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que el *NIPAL4* se expresa fundamentalmente a nivel de la capa granulosa de la epidermis, que es la zona donde los cuerpos lamelares están presentes<sup>196</sup>. Se desconoce qué defecto en la proteína producen las mutaciones descritas, pues se ha visto que no alteran la estabilidad del transcrito<sup>153</sup>.

**Mutaciones descritas.** Desde su descubrimiento<sup>119</sup>, tan solo nueve mutaciones en este gen han sido descritas en pacientes con ICAR procedentes de países mediterráneos como Argelia, Turquía, y Siria<sup>119</sup>, de países escandinavos como Suecia y Noruega<sup>153</sup>, de Paquistán<sup>196</sup>, de las islas Feroe<sup>153</sup> y de Sudamérica<sup>119</sup>. La mutación p.Ala176Asp, localizada en el exón 4, es la más frecuente y se ha descrito en distintas poblaciones sugiriendo que se puede tratar de un *hotspot*. En Paquistán se han descrito dos familias con esta mutación y con haplotipos comunes por lo que pudiera existir un efecto fundador en ese país<sup>196</sup>.

**Correlación genotipo-fenotipo.** El espectro clínico de los pacientes con mutaciones en este gen es muy amplio, y varía incluso entre miembros de la misma familia. La mayoría presentan fenotipo de EIC, aunque algunos tienen características de IL. La presencia de

membrana colodión al nacimiento es variable en los distintos estudios. En uno de ellos el 60% de los pacientes habían nacido con membrana colodión<sup>119</sup>, mientras que en otro solo uno de 27 la presentó<sup>153</sup>. Una vez que la membrana desaparece, los pacientes desarrollan descamación fina y blanquecina sobre una base eritematosa en la cara y el tronco y escamas más grandes y marronáceas en el cuello, las nalgas y las piernas<sup>119</sup>. Pueden presentar xerosis marcada, placas hiperqueratósicas reticuladas marronáceas generalizadas que se acentúan en los pliegues cutáneos y discromía facial<sup>153,196</sup>. Además, es frecuente que presenten queratodermia palmoplantar con fisuras y en ocasiones, asocian contracturas de los dedos y curvatura de las uñas. En algunos trabajos se han descrito rasgos más típicos de IL, con ausencia o mínimo eritema, ectropion e hipohidrosis<sup>153,196</sup>. También se ha descrito la presencia de signos y síntomas de dermatitis atópica en algunos pacientes, sin que en ninguno de ellos se detectaran mutaciones en el gen *FLG*<sup>196</sup>. Algunas enzimas y proteínas que se encuentran en los cuerpos lamelares, como la matriptasa, intervienen en el procesamiento de profilagrina a filagrina<sup>197</sup>. El síndrome de Netherton, que cursa con ictiosis y dermatitis atópica, es debido a alteraciones en un inhibidor de proteasas que se localiza en los cuerpos lamelares y cuyas mutaciones alteran el procesamiento de la profilagrina<sup>198,199</sup>. Del mismo modo, el producto codificado por el gen *NIPAL4* podría estar relacionado con la actividad de la filagrina<sup>196</sup>.

#### 1.5.1.4.4. *CYP4F22*

El gen *FLJ39501* o *CYP4F22*, codifica un citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2, homólogo del leucotrienio B<sub>4</sub>- $\omega$ -hidroxilasa (*CYP4F2*). Está localizado en el cromosoma 19p13.12<sup>200</sup>, contiene 43.792pb y codifica una proteína de 531 aminoácidos. Tiene doce exones (Fig. 15)<sup>121</sup>.

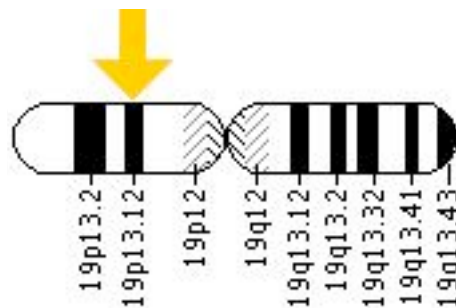


Figura 15. Localización del gen *CYP4F22* en el cromosoma 19.

**Mecanismo.** Se han descrito 57 genes humanos CYP, que se han clasificado en nueve clanes, dieciocho familias y 43 subfamilias atendiendo a sus similitudes de secuencia<sup>201</sup>. La reacción enzimática que cataliza el producto codificado por el gen *CYP4F22* en la piel y sus sustratos pueden ser deducidos por analogía con lo que se sabe de sus homólogos *CYP4F2* y *CYP4F3*. Los *CYP4F2* y *CYP4F3* son  $\omega$ -hidroxilasas del leucotrieno B4 (LTB4) en la vía de la 5-LOX, que es una vía paralela a la de la 12(R)-LOX. El *CYP4F2* es la principal enzima  $\omega$ -hidroxilasa del LTB4 en el hígado y riñón humano, pero no en los leucocitos polimorfonucleares donde no se expresa y donde la misma reacción es catalizada por la *CYP4F3*<sup>202</sup>. Por analogía con ellos, se deduce que el producto del gen *CYP4F22* puede tener una actividad  $\omega$ -hidroxilasa en la vía de la 12(R)-LOX<sup>121</sup>. Se ha hipotetizado que puede catalizar el paso de la trioxilina A3 a la 20-hidroxi(R)-trioxilina A3<sup>121</sup> y que el producto final de esta vía, la 20-carboxi-trioxilina A3, puede tener un efecto biológico regulatorio clave en la piel, antes de ser catabolizado a través de la  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas y probablemente también en las mitocondrias<sup>203</sup>.

**Mutaciones descritas.** Hasta la fecha solo se han descrito ocho mutaciones en este gen en doce familias consanguíneas procedentes de países del mediterráneo (Argelia, Francia, Italia y Líbano)<sup>121</sup> y en una familia de origen israelí<sup>177</sup>. La más frecuente es la mutación *missense* p.His435Tyr, que ha sido identificada en seis familias, todas de Argelia excepto una de origen francés<sup>121</sup>. El resto de mutaciones solo han sido identificadas en una ocasión.

**Correlación genotipo-fenotipo.** En las doce familias descritas por Lefèvre *et al.*<sup>121</sup>, la mayoría de pacientes presentaron un fenotipo de EIC al nacimiento que progresó más tarde a IL. Habitualmente nacen con marcada eritrodermia aunque sin membrana colodión. Con el tiempo desarrollan descamación generalizada blanquecino-grisácea, más exagerada en la región periumbilical, las nalgas y la parte inferior del cuerpo. Es frecuente la presencia de hiperlinealidad palmoplantar<sup>121</sup>. También tienen descamación en cuero cabelludo, en algunos casos de apariencia pitiriasiforme<sup>121</sup>. La clínica es distinta en la familia descrita por Lagussy *et al.*<sup>177</sup>. Los tres miembros afectados nacieron como bebés colodión y desarrollaron un cuadro de eritrodermia severa, descamación generalizada y queratodermia palmoplantar<sup>177</sup>. Un grupo finlandés describió una localización de ICAR casi idéntica a la descrita por Lefèvre *et al.*, en los cromosomas 19p13.1-p13.2, en una familia con fenotipo leve, no eritrodérmico, que no recordaba a la clásica IL o EIC. Sin embargo, los pacientes presentaban también hiperlinealidad palmoplantar<sup>200</sup>.

1.5.1.4.5. *ABCA12*

En 2003, el gen *ABCA12* fue descrito como responsable de la IL y fue mapeado en el cromosoma 2q34 (Fig. 16)<sup>15</sup>. Posteriormente se confirmó que mutaciones en este gen también eran responsables de la IA<sup>13,14</sup>. Contiene 206.885pb que codifican 53 exones.

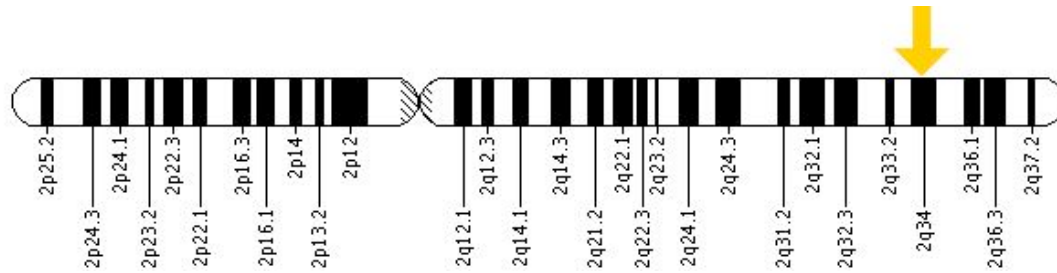


Figura 16. Localización del gen *ABCA12* en el cromosoma 2.

**Mecanismo.** El *ABCA12* pertenece a una familia de transportadores ABC, que ligan la adenosina trifosfato al tiempo que ayudan al transporte de varias moléculas a través de la membrana celular<sup>204</sup>. Los miembros de la subfamilia ABCA están todos implicados en el transporte lipídico y algunos de ellos han sido involucrados en el desarrollo de enfermedades genéticas que afectan al transporte de los lípidos, como la enfermedad de Tangier, la hipoalfalipoproteinemia familiar, la aterosclerosis prematura y la enfermedad de Stargardt<sup>205</sup>. Los transportadores *ABCA3* y *ABCA12* están muy relacionados. Se ha sugerido que ambos han surgido durante la evolución, cuando los vertebrados dejaron el ambiente acuático y comenzaron la vida en la tierra, para adaptar el sistema respiratorio y la piel al ambiente seco<sup>206</sup>. Defectos en el *ABCA3* son responsables del déficit fatal de surfactante en recién nacidos<sup>207</sup>. Este transportador interviene en la secreción del surfactante pulmonar en las células alveolares tipo II mediante la producción de gránulos lamelares similares a los que se ven en los queratinocitos<sup>208</sup>. De forma similar, los defectos en el *ABCA12* conllevan la alteración del transporte de lípidos a nivel de los gránulos lamelares determinando la disminución de lípidos intercelulares en la capa córnea<sup>14</sup>.

Estudios ultraestructurales han demostrado que el *ABCA12* se distribuye en la capa granulosa asociado a las glucosilceramidas. Se sitúa en los gránulos lamelares extendiéndose desde la membrana limitante del aparato de Golgi hasta la periferia celular<sup>205</sup>. Queratinocitos epidérmicos cultivados de pacientes con IA portadores de mutaciones en el gen *ABCA12* y modelos murinos han demostrado la relación de este gen con la alteración en la distribución y el

transporte de glucosilceramidas y con la disminución de los niveles de hidroxiceramidas, uno de los componentes principales de la barrera lipídica, a nivel del espacio intercelular<sup>14,17,206,209</sup>. Akiyama *et al.*<sup>14</sup> consiguieron revertir el fenotipo de queratinocitos cultivados de pacientes con IA mediante la transferencia correctiva del gen *ABCA12* *in vitro*.

La enorme hiperqueratosis que se produce en estos pacientes podría ser una respuesta compensadora ante el defecto de la barrera lipídica y la consiguiente pérdida de la función barrera de la piel<sup>210</sup>. Sin embargo, estudios en modelos murinos indican que la hiperqueratosis se debe más a la falta de descamación de los corneocitos que a la proliferación de queratinocitos basales<sup>209</sup>. Los defectos en el transporte de ciertas proteasas causadas por las alteraciones en los gránulos lamelares podrían determinar la deficiente descamación. La calicreína 5 y la catepsina D, dos proteasas que actúan degradando las uniones intercelulares entre los corneocitos, están dramáticamente disminuidas en pacientes con IA<sup>211</sup>. Por otra parte, teniendo en cuenta que la clínica de la IA comienza a desarrollarse en el útero, cuando la función barrera epidérmica aún no es necesaria, otros mecanismos deben de estar implicados en la patogénesis de esta enfermedad, al menos durante el periodo fetal. Modelos murinos y estudios *in vitro* indican que el defecto del *ABCA12* tiene también efecto sobre la diferenciación epidérmica, resultando tanto en incapacidad para la diferenciación terminal, como en la prematura diferenciación de la epidermis<sup>211-213</sup>.

**Mutaciones descritas.** Hasta la fecha se han descrito más de 50 mutaciones en el gen *ABCA12*, en pacientes con ICAR procedentes de África, Europa, Paquistán, y Japón. Del total de mutaciones, el 36% son *nonsense*, el 25% son *missense*, el 20% son pequeñas deleciones y el 20% restantes son mutaciones *splice-site*, grandes deleciones e inserciones. Al menos el 62,5% de ellas resultan en una proteína trunca. Aparentemente no existe ningún *hotspot* a lo largo del gen, aunque las mutaciones que subyacen el fenotipo de IL parece que se concentran en la región del primer *cassette* ligador de ATP<sup>15</sup>.

La mutación más frecuente hasta la fecha es la p.Val244SerfsX28 que se localiza en el exón 49, y que ha sido identificada únicamente en población paquistaní e india<sup>13,214,215</sup>. De hecho, en un estudio, el 80% de los pacientes con IA de esa región contienen esa mutación debido a un posible efecto fundador<sup>215</sup>. La segunda mutación más frecuente es la mutación *missense* p.Asn1380Ser, que se ha identificado en cinco familias con IL de África y también es una mutación fundadora<sup>15</sup>. Otras mutaciones han sido identificadas en varias familias no

relacionadas y de diferentes orígenes geográficas, por lo que no se puede descartar la existencia de otras mutaciones fundadoras<sup>13,15,214-218</sup>.

**Correlación genotipo-fenotipo.** La severidad de las mutaciones que afectan al *ABCA12* se relaciona con el fenotipo clínico que desarrollará el paciente. En los pacientes con IA, la mayoría de las mutaciones afectan a regiones altamente conservadas de la proteína y conducen a la pérdida completa de su función. Las mutaciones en el gen *ABCA12* que producen pérdida completa de su función siempre resultan en fenotipo de IA. Por ello, al menos una mutación en cada alelo tiene que ser truncante o una deleción que afecte a una región altamente conservada de la proteína para que se desarrolle la IA<sup>13,14,214,215,218-220</sup>.

Por el contrario, en la IL y la EIC, la mayoría de las mutaciones en el gen *ABCA12* son mutaciones *missense* que alteran la función de la proteína de forma menos severa<sup>15</sup>. En la IL, cinco mutaciones en el gen *ABCA12* han sido descritas en nueve familias de origen africano, todas ellas localizadas en el primer *cassette* ligador de ATP. Los pacientes afectados habían nacido como bebés colodión y presentaban escamas generalizadas grandes y oscuras, ectropion, queratodermia palmoplantar y ausencia de eritema. Todos eran homocigotos o heterocigotos para mutaciones *missense* que alteraban un único aminoácido<sup>15</sup>. También se han identificado mutaciones en el gen *ABCA12* como responsables de EIC. Se han detectado diez mutaciones en ocho familias<sup>16,17,221</sup>. Clínicamente presentan escamas de mediano tamaño, algo más grandes que las que habitualmente se observan en los pacientes con este fenotipo.

A pesar de que existe cierto grado de correlación entre genotipo y fenotipo, algunas mutaciones se han detectado en pacientes con distintos cuadros clínicos. Así, la mutación p.Arg1514His se ha identificado en IL y EIC<sup>15</sup> y las mutaciones p.Arg1950X y la p.Arg2482X, se detectaron en pacientes con EIC e IA<sup>222</sup>.

### 1.5.2. ICTIOSIS ARLEQUIN

La IA o feto arlequín es una forma de ictiosis grave y generalmente fatal. El niño es frecuentemente prematuro y nace con placas hiperqueratósicas extensas y brillantes recubriendo todo el tegumento. Estas placas están separadas por fisuras profundas que tienden a configurar patrones geométricos que remedan a las vestimentas parcheadas de los payasos

arlequines, de ahí el nombre de la entidad. La tirantez de la piel resulta en marcada eversión de los párpados y de los labios, desarrollo rudimentario de los cartílagos auriculares y nasales, y en ocasiones, microcefalia. No suelen tener pestañas ni cejas, aunque el pelo del cuero cabelludo puede estar conservado. Las manos y los pies están hinchados y edematosos, muchas veces cubiertos por una coraza a modo de guante. Pueden tener contracturas de los dedos (Fig. 17).

El riesgo de mortalidad de estos niños durante el periodo neonatal es muy alto<sup>223</sup>. Se puede producir inestabilidad térmica debido a la importante pérdida transepidermica de agua que conduce a la deshidratación y al desequilibrio hidroelectrolítico. La coraza que forma la piel produce compresión torácica que puede comprometer la ventilación pulmonar. El riesgo de infecciones también está aumentado, y debido a los defectos en la termorregulación éstas pueden presentarse sin los signos habituales. La tirantez facial y el eclabium dificultan la succión y por tanto la alimentación del niño, llevando a hipoglucemia y agravando la deshidratación, lo que puede conducir a insuficiencia renal y convulsiones.

Los neonatos afectados rara vez sobrevivían más allá de las primeras semanas de vida. En los últimos años, las probabilidades de supervivencia a largo plazo han aumentado notablemente, debido fundamentalmente al uso de los retinoides sistémicos y a los avances de los cuidados intensivos neonatales<sup>224</sup>. En un estudio reciente de 45 pacientes con IA, el 83% de los pacientes tratados con retinoides orales sobrevivieron frente al 24% de los no tratados. La mayoría de las muertes ocurrieron en los tres primeros días de vida, mientras que en muchos de los supervivientes el tratamiento se introdujo más tarde<sup>223</sup>. Esto sugiere que muchas de estas muertes tempranas hubieran ocurrido independientemente del tratamiento con retinoides.

Los niños que sobreviven al periodo neonatal por lo general desarrollan un cuadro de EIC severa, lo que condujo a la controversia acerca de las diferencias entre ambas entidades<sup>225</sup>. La naturaleza y localización de las mutaciones en el gen *ABCA12* y el nivel de pérdida de funcionamiento del transportador en estos pacientes pueden tener alguna relevancia en la diferencia de pronóstico<sup>14,206,226</sup>. Pacientes que conservan cierta actividad de la proteína, aunque sea mínima, pueden tener mayores posibilidades de supervivencia. Portadores de mutaciones homocigotas tienen una mortalidad mayor<sup>223</sup>.

La característica histológica principal es la presencia de un estrato córneo ortoqueratósico extremadamente engrosado y compacto. En algunos casos se ha observado paraqueratosis. Los folículos pilosos y los ductos sudoríparos tienen prominentes tapones hiperqueratósicos<sup>226,227</sup>.

Las características ultraestructurales de la IA incluyen cuerpos lamelares anormales o ausentes en la capa granulosa, presencia de inclusiones lipídicas o remanentes de organelas o de núcleos en los corneocitos y ausencia de la capa de lípidos intercelulares<sup>227,228</sup>. Este defecto en los gránulos lamelares también se ha visto en pacientes con EIC y mutaciones en el gen *ABCA12*, aunque el estudio ultraestructural en estos casos evidencia la presencia de gránulos normales entremezclados con los alterados<sup>229</sup>. Otros cambios menos frecuentes incluyen gránulos de queratohialina pequeños o ausentes, mitocondrias gigantes y formación prematura de la banda marginal<sup>227</sup>. Los folículos pilosos muestran marcada acumulación concéntrica de material queratótico alrededor de los pelos, lo que es considerado una característica diagnóstica de IA y ha sido usado para establecer el diagnóstico de forma prenatal.

Hasta la fecha, la tasa de detección de mutaciones en el gen *ABCA12* en pacientes con IA es cercana al 100%, por lo que parece que es un cuadro genéticamente homogéneo. Rajpopat *et al.*<sup>223</sup> usando secuenciación directa y PCR estándar no detectaron mutaciones en tres de 45 pacientes. En otro trabajo, mediante esta misma técnica no se detectaron alteraciones en un único paciente<sup>13</sup>, pero posteriormente mediante PCR multiplex y un *array* de oligonucleótidos sí se identificó una delección del exón 8<sup>214</sup>.

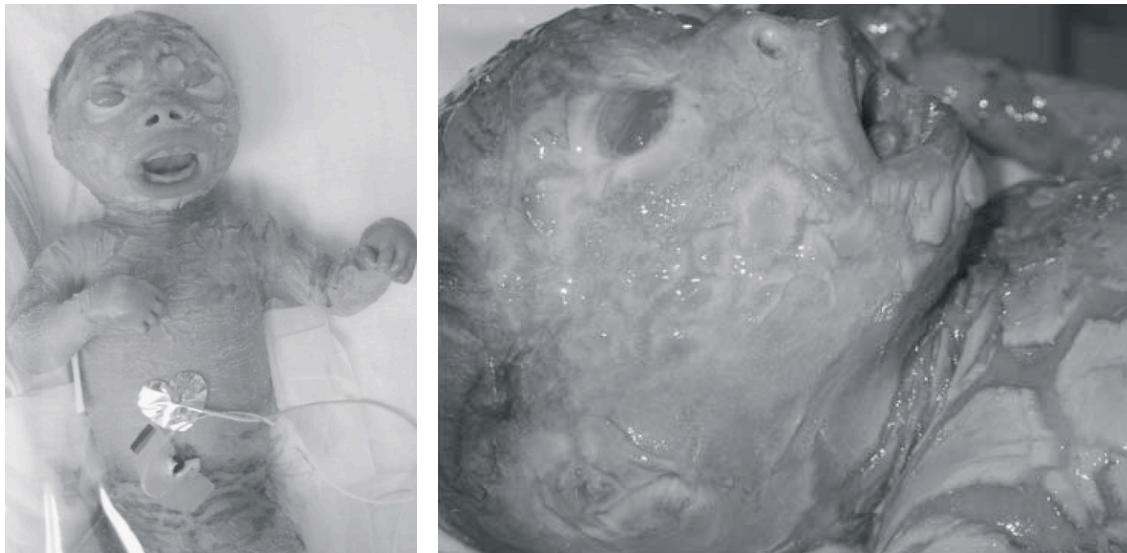


Figura 17. Aspecto clínico de la IA. (Extraído de Harvey *et al.*, 2009).

### 1.5.3. BEBÉ COLODIÓN. BEBÉ COLODIÓN AUTORRESOLUTIVO

El bebé colodión es la forma de presentación común de varias ictiosis congénitas, especialmente de las ICAR. Los bebés colodión son habitualmente prematuros. Al nacimiento, el neonato está cubierto por una membrana brillante, transparente y tirante que recuerda a una envuelta de celofán (Fig. 18). Esta membrana está formada por la capa córnea engrosada y su tirantez determina frecuentemente la presencia de ectropion y eclabium y la hipoplasia de los cartílagos nasales y auriculares.

La mortalidad y morbilidad perinatal están aumentadas. La succión y la ventilación pulmonar pueden estar dificultadas, resultando en deshidratación, malnutrición, hipoxia e infecciones pulmonares<sup>230</sup>. Pueden desarrollarse profundas fisuras que llevan a la pérdida transepidérmica de agua y calor y permiten la entrada de microorganismos que pueden causar infecciones cutáneas<sup>230,231</sup>. Bandas circulares de piel engrosada pueden provocar constricción vascular y edema distal. A lo largo de las dos primeras semanas de vida la membrana se va desprendiendo y se produce la transición hacia el fenotipo de la enfermedad subyacente.

El bebé colodión es habitualmente la forma de presentación de la IL y la EIC. La IL autosómica dominante<sup>10,11</sup>, el síndrome de Sjögren-Larsson<sup>230</sup>, la tricotiodistrofia<sup>232</sup>, la enfermedad de Gaucher infantil<sup>230</sup>, la enfermedad por almacenamiento de lípidos neutros, el síndrome de Conradi-Hünemann-Happle, el síndrome de Hay-Wells y las displasias ectodérmicas<sup>233</sup> también pueden manifestarse ocasionalmente como bebé colodión<sup>12</sup>.

En el 10-24% de los neonatos<sup>1,230</sup> la membrana desaparece espontáneamente dejando la piel totalmente normal. En el pasado estos casos se conocían como IL del recién nacido<sup>234</sup> y actualmente como BCAR<sup>235</sup>. Algunos autores proponen hablar de bebé colodión con auto-mejoría, porque muchos de los pacientes, cuando son reexaminados en la juventud o en la 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 alrededor del cuello<sup>192</sup>.

Tanto la microscopía óptica como la ultraestructura del bebé colodión no son específicos. Por ello, es preferible diferir la biopsia cutánea hasta que se haya desarrollado el fenotipo definitivo. Con el microscopio óptico se observa exclusivamente un estrato córneo engrosado y

ortoqueratósico que no ayuda a predecir el fenotipo final que desarrollará el paciente. Se ha sugerido que la microscopía electrónica en el periodo neonatal temprano podría ayudar a establecer el diagnóstico final del paciente. En las formas autorresolutivas, la biopsia en el primer día de vida muestra una epidermis de arquitectura normal y un estrato córneo engrosado pero normalmente distribuido. A los quince días, cuando el paciente aún presenta membrana colodión, el estrato córneo ya tiene un grosor y morfología normales. Los bebés colodión que evolucionan a IL presentan la epidermis desestructurada con corneocitos anormalmente queratinizados, grandes y convolutos que contienen restos de organelas. A diferencia de las formas autorresolutivas, a los quince días se observan numerosas vacuolas lipídicas en los corneocitos<sup>236,237</sup>.

Mutaciones en los genes *TGM1*<sup>18,238</sup>, *ALOXE3*<sup>192</sup> y *ALOX12B*<sup>143,192,193</sup> han sido identificadas en pacientes con BCAR, siendo el *ALOX12B* el gen más frecuentemente mutado. Hasta la fecha se han identificado mutaciones en dieciocho pacientes con BCAR, diez de ellos (55,5%) presentaban mutaciones en el gen *ALOX12B*, cinco (27,8%) en el gen *TGM1* y tres (16,7%) en el gen *ALOXE3*. En una serie de quince pacientes con BCAR de Escandinavia, se identificaron mutaciones en doce de ellos. En el 67% (8/12) se identificaron mutaciones en el gen *ALOX12B*, en el 25% (3/12) en el gen *ALOXE3* y en el 8,3% en el gen *TGM1*<sup>192</sup>. En algunos pacientes no se encontraron mutaciones por lo que otros genes deben de estar también implicados.

Las primeras mutaciones identificadas en el BCAR afectaban al gen *TGM1*. Se ha especulado que estas mutaciones reducen la actividad enzimática en el útero pero no en vivo<sup>18</sup>. Estudios de modelización molecular y ensayos bioquímicos sugieren que en el útero, donde la presión hidrostática es elevada, se produce la quelación de moléculas de agua que convierte a la enzima mutado en una conformación *trans* inactiva, reduciéndose de forma significativa su actividad. Después del nacimiento, al bajar la presión hidrostática, la enzima vuelve a su forma activa *cis*. Esto incrementa su actividad hasta el 40%, lo cual puede ser suficiente para mantener el fenotipo normal o mínimamente alterado<sup>18</sup>.

Algunas de las mutaciones en los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* descritas en pacientes con BCAR han sido también encontradas en otros pacientes con EIC, lo cual sugiere que otros factores deben de estar implicados en el desarrollo de cada fenotipo<sup>192</sup>. Las mismas mutaciones en el gen *TGM1* también se han asociado fenotipos de IL, BCAR<sup>192</sup> e ITB<sup>238</sup>.



Figura 18. Bebé colodion.

#### 1.5.4. BEBÉ COLODIÓN AUTORRESOLUTIVO ACRAL

Aunque el bebé colodión es un cuadro generalizado, se han descrito casos de bebé colodión localizado a nivel acral. Finlay y Bound<sup>239</sup> describieron, en 1952, un caso de membrana colodión que afectaba exclusivamente a las manos y los pies y que siguió un curso autorresolutivo (Fig. 19).

Recientemente, se ha descrito un nuevo caso de BCAR acral<sup>19</sup>. El paciente era el segundo hijo de padres sanos y aparentemente no consanguíneos y tenía una hermana con un fenotipo clásico de IL. El estudio genético identificó en la familia tres mutaciones distintas en el gen *TGM1*. Los distintos fenotipos observados en la familia se debían a distintas combinaciones de mutaciones con diferentes efectos en la función de la proteína. Una de las proteínas mutadas en la niña con el cuadro acral autorresolutivo presentaba cierta actividad enzimática (12,8%) que podría ser suficiente para construir una epidermis normal en el periodo postnatal, pero insuficiente en el periodo intraútero. De ser así, los diferentes requerimientos en el periodo post y prenatal podrían indicar la existencia de algún regulador de la actividad enzimática dependiente del periodo vital. Tampoco se conoce por qué las lesiones se restringen a la zona acral, aunque también podrían existir otros factores reguladores dependientes de localización<sup>19</sup>.

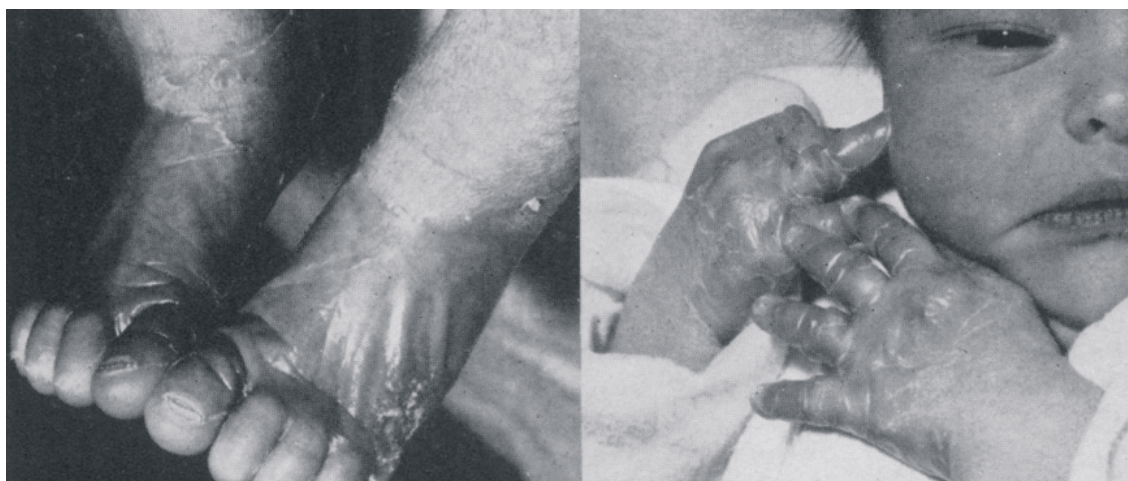


Figura 19. BCAR acral. La membrana colodión termina de forma neta a nivel de tobillos y muñecas. (Extraído de Finlay y Bound, 1952).

### 1.5.5. ICTIOSIS EN TRAJE DE BAÑO

La ITB es una variante fenotípica rara de las ICAR. Aunque desde hace años se habían descrito pacientes con cuadros de ictiosis con distribución peculiar<sup>170,240,241</sup>, fue en 2005 cuando se describió la ITB como una variedad independiente de ICAR.

La ITB se ha detectado mayoritariamente en pacientes de origen Sudafricano<sup>20</sup>, pero también en individuos procedentes de Europa y países del área mediterránea (Alemania, Holanda, Francia, Turquía y Marruecos)<sup>242</sup>. Clínicamente se presentan al nacimiento con una membrana colodión que recubre la totalidad de la piel. A medida que ésta se desprende se observa una distribución característica de las escamas. La descamación afecta al tronco y a la zona proximal de las extremidades superiores, incluyendo la axila. El cuello y el cuero cabelludo también están afectados, pero la zona central de la cara está respetada. Tampoco se afectan las extremidades y el área lumbar suprarrenal<sup>20</sup>. Las escamas son grandes, laminares y oscuras. En algunos pacientes se detecta descamación más fina a nivel de los huecos poplíteos y fosas antecubitales<sup>242,243</sup>. Las palmas y las plantas están secas y presentan leve hiperqueratosis difusa. El dorso de manos y pies, al igual que las uñas, no presentan alteraciones.

El estudio histopatológico de la piel afectada muestra a nivel de la epidermis marcada hiperqueratosis sin paraqueratosis, granulosa normal, acantosis leve o moderada y leve infiltrado linfocítico en la dermis alta<sup>20</sup>.

La microscopía electrónica en la mayoría de los casos es compatible con la ictiosis congénita tipo 2. La piel no afectada no presenta alteraciones<sup>242,243</sup>. La actividad de la enzima TGasa 1 es diferente en la piel afectada y no afectada. En la piel sana, su actividad está ligeramente reducida y se localiza de forma normal a nivel pericelular. En la piel afectada, la actividad enzimática es residual y se localiza de forma anormal a nivel citoplasmático<sup>242</sup>.

Se han detectado mutaciones en el gen *TGM1* en todos los pacientes con ITB estudiados hasta la fecha<sup>238,242-244</sup>. La mutación más frecuente es la p.Arg315Leu, que se ha identificado en la mayoría de pacientes de origen sudafricano. Todos ellos pertenecían a los mismos grupos étnicos, lo cual sugiere que pueda haber un efecto fundador.

Algunas de las mutaciones identificadas en pacientes con ITB han sido previamente descritas en pacientes con formas generalizadas de ICAR<sup>174</sup>. Se cree que estas mutaciones codifican un producto no funcional que da lugar a cuadros de ictiosis generalizados. Sin embargo, en los pacientes con ITB las mutaciones *missense* que se identifican en el otro alelo podría producir una proteína funcionalmente activa en determinadas condiciones, lo que explicaría las zonas de piel de aspecto normal que presentan<sup>242</sup>.

Oji *et al.*<sup>242</sup> sugirieron que la temperatura de la piel podría jugar un papel en el desarrollo de la ITB y demostró, mediante termografía digital, una fuerte correlación entre la temperatura corporal y la presencia de descamación, siendo las zonas más calientes del cuerpo las que estaban afectadas.

Aufvenne *et al.*<sup>245</sup> demostraron que existe marcada reducción de la temperatura óptima para la actividad de la enzima TGasa 1 en los pacientes con ITB. La temperatura óptima para la enzima normal es de 37°C, mientras que para la enzima mutada es de 31°C. Estas variaciones de actividad enzimática dependientes de la temperatura no se observan en controles sanos ni en pacientes con IL generalizada, y explicarían el fenotipo de los pacientes (Fig. 20).

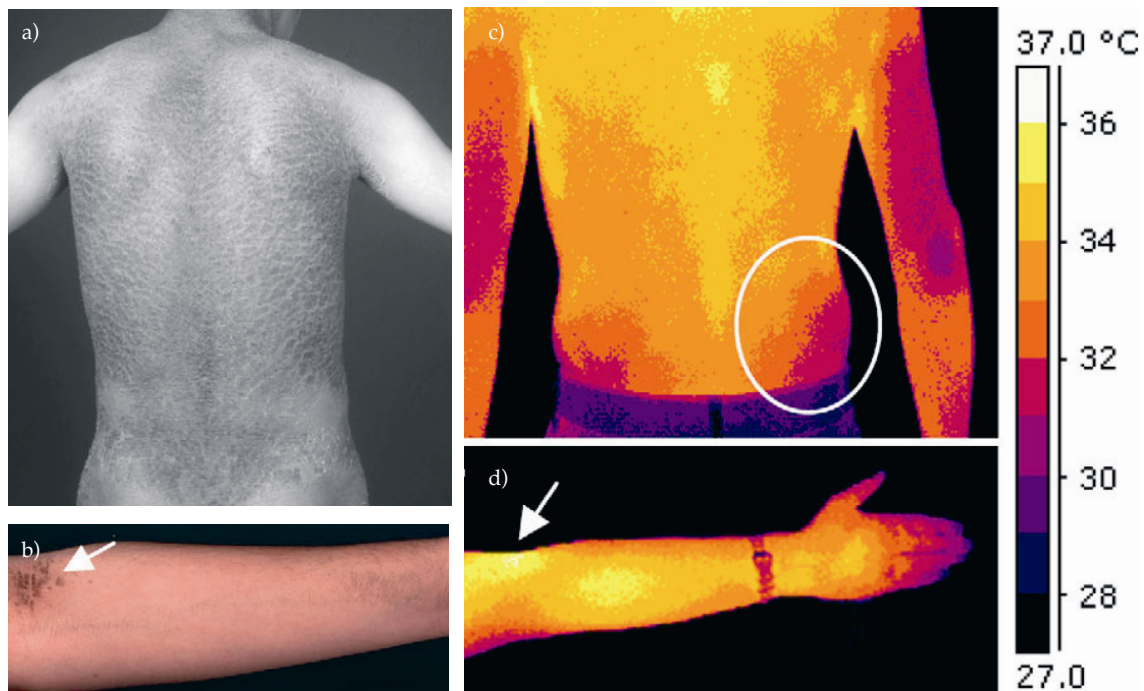


Figura 20. Ictiosis en traje de baño. a) Descamación laminar confinada al tronco y respetando las extremidades. b) Afectación de hueso poplíteo. b) Imagen térmica digital en un individuo sano. Las zonas de mayor temperatura coinciden con las zonas afectadas. Los flancos no está afectados y se corresponden con una zona de menor temperatura en la imagen térmica (círculo). La fosa antecubital se corresponde con una zona de mayor temperatura (flecha). (Extraído de Oji *et al.*, 2006).

## 1.6. TRATAMIENTO

El objetivo primario del tratamiento en las ictiosis es eliminar las escamas y reducir la xerosis cutánea sin causar mucha irritación. Para conseguirlo hay que tener en cuenta una serie de aspectos antes de indicar el tratamiento<sup>246</sup>.

- Edad y sexo del paciente. Los niños tienen la piel más fina y mayor superficie cutánea en relación con su peso corporal, lo que incrementa el riesgo de toxicidad sistémica. Las mujeres en edad fértil no deben exponerse a tratamientos potencialmente teratogénicos.
- El tipo y severidad de la enfermedad. Las escamas gruesas requieren queratolíticos, la xerosis solo emolientes, y las fisuras y erosiones queratolíticos y agentes antimicrobianos.

- La extensión y localización de las lesiones. La aplicación de productos tópicos en todo el cuerpo aumenta el riesgo de toxicidad sistémica. En la cara y las flexuras debemos emplear tratamientos menos potentes porque el riesgo de irritación es mayor.

Los pacientes con ictiosis tienen además una serie de problemas médicos, relacionados directa o indirectamente con los mecanismos patogénicos de la enfermedad, que son potenciales dianas para tratamientos. Estos incluyen el prurito, la presencia de fisuras dolorosas, la disminución del rango de movilidad en las articulaciones y de la sensibilidad táctil en los dedos, la hipohidrosis y la intolerancia al calor, la tendencia a la irritación de la piel y, en algunos casos, la tendencia a las infecciones cutáneas.

### **1.6.1. BAÑO Y ELIMINACIÓN MECÁNICA DE LAS ESCAMAS**

Es recomendable que los pacientes con ICAR se bañen a diario, incluso dos veces al día, para eliminar mecánicamente las escamas y los restos de crema frotando con un paño suave, una toalla de microfibras o una piedra pómez. Esto es más sencillo si el paciente está a remojo 15-30 minutos antes. Algunos autores recomiendan añadir bicarbonato sódico al baño, porque desnaturaliza la queratina y hace el agua alcalina, lo cual ayuda a eliminar las escamas<sup>247</sup>. Si el bicarbonato sódico produce escozor puede emplearse solo dos o tres veces por semana<sup>247</sup>. Otros aditivos que se pueden emplear son el almidón de trigo, maíz o arroz. El aceite de baño no es tan adecuado porque puede producir oclusión.

### **1.6.2. TRATAMIENTO TÓPICO**

Los emolientes y los queratolíticos tópicos suelen ser la primera opción terapéutica en los pacientes con ICAR. Mejoran la función barrera de la piel y facilitan la descamación. Son bastante seguros aunque pueden producir leves efectos adversos a nivel local, como prurito, irritación o escozor transitorio.

Como agentes hidratantes y lubricantes se pueden emplear el cloruro sódico, la urea, la vitamina E acetato, el glicerol y la vaselina, que aumentan la capacidad ligadora de agua de la

capa córnea. En los pacientes con escamas gruesas e hiperqueratois marcada se puede añadir uno o más agentes queratolíticos, que promueven la descamación y disuelven las queratinas y los lípidos. Como queratolíticos se pueden usar los  $\alpha$ -hidroxiácidos (ácido láctico y ácido glicólico)<sup>248</sup>, el ácido salicílico, la N-acetilcisteína<sup>249,250</sup>, la urea (>5%)<sup>251</sup> y el propilenglicol. También se pueden usar moduladores de la diferenciación de los queratinocitos como los retinoides tópicos (tretinoína, adapaleno y tazaroteno)<sup>252,253</sup>, el calcipotriol<sup>254</sup> y el dexpanthenol. Para aumentar la efectividad de los queratolíticos o emolientes puede emplearse la terapia oclusiva en áreas concretas rebeldes al tratamiento. El propilenglicol (30-50%) de forma oclusiva es eficaz para tratar la hiperqueratosis palmoplantar<sup>255</sup>. En cuero cabelludo puede utilizarse una crema lavable de urea al 7-10% dejándola en oclusión toda la noche<sup>247</sup>.

El tratamiento debe de optimizarse en cada caso porque existe gran variabilidad individual en la sensibilidad de la piel y su respuesta a cada tratamiento. Para ello pueden hacerse comparaciones lado a lado, tratando cada mitad del cuerpo de forma diferente.

Los neonatos y los niños pequeños deben tratarse con un vehículo sin medicación porque su piel es más fina y sensible y no toleran la mayoría de queratolíticos. Además, en comparación con los adultos, tienen mayor superficie cutánea en relación con su peso por lo que el riesgo de absorción percutánea de productos tópicos es mayor. La urea no se debe usar en el primer año de vida porque causa irritación y por el riesgo de niveles sanguíneos de urea elevados<sup>256</sup>. El ácido salicílico tampoco se debe emplear en niños pequeños por el riesgo de absorción sistémica<sup>257</sup>. En niños más mayores y adultos puede emplearse para tratar pequeñas áreas rebeldes pero no de forma continuada. También se han descrito casos de intoxicación por aplicación tópica de ácido láctico en los niños pequeños<sup>258</sup>. Los retinoides tópicos causan con frecuencia irritación y pequeñas fisuras muy dolorosas<sup>254</sup>. Además, si se usan de forma generalizada, existe riesgo de absorción y teratogenicidad en mujeres en edad fértil<sup>259</sup>.

Mediante la combinación de dos o más agentes queratolíticos o emolientes se pueden conseguir efectos aditivos o sinérgicos. En un ensayo clínico con veinte pacientes se vio que la combinación de ácido láctico (5%) y propilenglicol (20%) era más efectiva que cada uno de ellos por separado<sup>260,261</sup>. La asociación de propilenglicol (60%), etanol (20%) y ácido salicílico (6%) en oclusión también es más eficaz que el propilenglicol (60%) solo<sup>262</sup>.

### 1.6.3. TRATAMIENTO SISTÉMICO

Los retinoides orales tienen efectos queratolíticos que facilitan la eliminación de las escamas y previenen la hiperqueratosis excesiva. Tanto la isotretinoína como los retinoides aromáticos (acitretino y etretinato) han sido eficaces en el tratamiento de las ICAR<sup>246,263,264</sup>. El acitretino a dosis de 0,5-1mg/Kg/día es el fármaco más usado, especialmente en la IL<sup>265</sup>. Los efectos beneficiosos se empiezan a notar a las 1-2 semanas de empezar el tratamiento y recurren cuando éste se suspende. Los pacientes con EIC pueden responder de forma más completa y con dosis más bajas.

Los principales efectos adversos son las alteraciones mucocutáneas, la teratogenicidad, las alteraciones musculoesqueléticas y del perfil lipídico y la elevación de las transaminasas<sup>266-269</sup>.

En cuanto a la teratogeneidad, en el caso del etretinato y del acitretino, se debe evitar el embarazo durante el tratamiento y hasta tres años después de suspenderlo<sup>268</sup>. La isotretinoína tiene una vida media más corta (10-20 horas) y se elimina totalmente del organismo al cabo de un mes, por ello puede ser preferible en mujeres que consideren un embarazo<sup>246</sup>.

Se recomienda para monitorizar el tratamiento realizar una analítica con función hepática y perfil lipídico antes de iniciarlo, un mes después y luego cada tres meses. En las mujeres en edad fértil, debe realizarse un test de embarazo en las dos semanas previas a iniciar la terapia y realizarse una contracepción efectiva desde cuatro semanas antes de iniciar el tratamiento hasta tres años después (en el caso del acitretino). Cuando se requiere un tratamiento prolongado con retinoides, como es el caso de las ICAR, se deben monitorizar los parámetros de crecimiento y desarrollo óseo. Aunque algunos autores proponen realizar un estudio óseo previo al tratamiento y un seguimiento anual<sup>268</sup>, las guías más recientes no recomiendan la realización de radiografías rutinarias por sus potenciales efectos dañinos<sup>269</sup>. Solo en el caso de que el paciente presente dolores musculoesqueléticos atípicos se recomienda realizar radiografías selectivas<sup>269</sup>.

Una alternativa para el tratamiento con retinoides sistémicos es utilizar fármacos conocidos como RAMBAs que bloquean el catabolismo del ácido retinoico y aumentan así sus niveles endógenos. Uno de ellos es el liarozole, que ha sido declarado medicación huérfana para el tratamiento de la IL, EIC e IA por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y por la FDA. Este fármaco inhibe la función de varias isoenzimas del citocromo P450, incluyendo la que limita del catabolismo del ácido retinoico, con lo que sus niveles aumentan en el plasma y

predominantemente en la piel<sup>270-272</sup>. Este fármaco ha demostrado en ensayos clínicos ser más eficaz que el acitretino y ofrecer mejor perfil farmacocinético y tolerabilidad<sup>271</sup>.

#### 1.6.4. OTROS CUIDADOS

Los pacientes con ectropion tienen que aplicar lágrimas artificiales y lubricantes oculares. La hidratación de la piel de la cara, sobre todo de las mejillas, también disminuye la retracción palpebral. La corrección quirúrgica es una opción válida en casos severos, pero habitualmente tiene que repetirse al cabo de unos años. La hipohidrosis es un problema importante en muchos pacientes y conlleva riesgo de golpes de calor y convulsiones. Se debe recomendar al paciente que evite actividades extenuantes cuando la temperatura es alta. Haenssle *et al.*<sup>273</sup> reportaron la mejoría de la distermorregulación en un paciente con EIC al tratarlo con retinoides orales. También es importante la terapia física para evitar contracturas en flexión, especialmente en la IA. Algunos niños presentan oclusión recurrente o persistente del conducto auditivo externo por las escamas que puede causar pérdidas auditivas. Por ello, pueden necesitar limpieza periódica del oído por un otorrinolaringólogo.

#### 1.7. CONSEJO GENÉTICO Y DIAGNÓSTICO PRENATAL

Cuando se diagnostica un paciente con ictiosis, se le debe ofrecer al paciente o a otros miembros de la familia, como los padres, consejo genético apropiado, explicando la naturaleza del trastorno, su modo de herencia y la probabilidad de futuras manifestaciones de la enfermedad en la familia.

En enfermedades severas, como la IA, el síndrome de Sjögren-Larsson y las formas severas del síndrome de Netherton o de las ictiosis queratinopáticas, el diagnóstico prenatal ofrece información importante a los padres con riesgo de tener hijos afectados. Sin embargo, la situación ética es diferente para otros tipos de ictiosis, como formas moderadas o leves de IL y EIC, que aunque no pueden ser curadas completamente, pueden ser tratadas de forma bastante eficaz. El diagnóstico prenatal nos permite saber si el feto está afectado, y consecuentemente

llevar a cabo la preparación psicosocial y económica en la familia, anticipar problemas del embarazo y del parto, y dar a los padres la opción de abortar, sobre todo en casos donde no existe tratamiento. Además, de existir en el futuro un tratamiento génico adecuado, nos permitiría que este se realizara lo más temprano posible.

Durante más de veinte años, el diagnóstico prenatal se realizaba a partir de una biopsia de piel fetal que era estudiada mediante microscopía óptica, microscopía electrónica o inmunohistoquímica. La eritrodermia ictiosiforme congénita ampollosa y la epidermólisis ampollosa juntural fueron las primeras entidades diagnosticadas exitosamente mediante estas técnicas<sup>274,275</sup>. Este procedimiento invasivo solo se podía llevar a cabo en las fases tardías del embarazo, entre las semanas quince y 23 de la gestación, y se asociaba a un riesgo de pérdida fetal de un 1-3%, a pérdidas de líquido amniótico y a cicatrices fetales<sup>276,277</sup>.

La identificación de las bases moleculares de los desórdenes cutáneos hereditarios, ha permitido llevar a cabo el diagnóstico prenatal en etapas más tempranas de la gestación mediante técnicas basadas en el estudio del ADN<sup>220,278-280</sup>. En estos casos, el ADN fetal se obtiene mediante una amniocentesis realizada entre las semanas quince y veinte o mediante una biopsia de vellosidades coriónicas (BVC) obtenida entre las semanas diez y doce. El riesgo de pérdida fetal con estas técnicas es menor del 0,5%-1%<sup>281</sup>. La incidencia de hemangiomas infantiles es tres veces mayor tras una BVC que tras una amniocentesis, en la que el riesgo es igual al de la población normal<sup>282</sup>. Además, la BVC se ha asociado al aumento de riesgo de defectos en las extremidades si se realiza antes de las diez semanas. Otros riesgos de estas técnicas son el sangrado vaginal, la infección y la pérdida de líquido amniótico.

A pesar de estos avances, los pacientes que portan un feto enfermo tienen pocas opciones terapéuticas aparte de la terminación del embarazo. Algunos pacientes pueden no aceptar esta opción, que además puede conllevar problemas físicos y psíquicos. El diagnóstico genético preimplantacional permite que los embriones sean estudiados tras una fertilización *in vitro*, de modo que solo los sanos sean implantados en el útero, eliminando la necesidad de un aborto en la mayoría de los casos<sup>283</sup>. En este caso se extraen una o dos células del embrión en la etapa de 6-10 células. A diferencia de la amniocentesis y de la BVC, el material genético del que se dispone es mucho menor y el diagnóstico debe de hacerse en 12-48 horas para permitir la adecuada reimplantación del embrión. Actualmente, el riesgo de transferir un feto afectado equivocadamente identificado como normal es del 2% para las enfermedades autosómicas recesivas y del 11% para las dominantes<sup>281</sup>.

Otros métodos no invasivos que se están desarrollando son el estudio de ADN de células fetales o ADN fetal libre en la circulación materna<sup>284</sup> y el uso de ultrasonografía tridimensional. En el caso de la IA, la ecografía bidimensional prenatal rutinaria puede revelar la existencia de líquido amniótico ecogénico, contracturas articulares grandes y digitales y dismorfismo facial, incluyendo cara plana y boca amplia con labios engrosados. Algunas de estas alteraciones pueden ser ya evidentes en la semana diecisiete<sup>285</sup>. El diagnóstico se puede confirmar mediante ecografía tridimensional<sup>285,286</sup>.

## 1.8. FUTURAS ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO GÉNICO DE LAS ICTIOSIS

Al igual que se han producido avances importantes en el diagnóstico genético y el conocimiento de la patogénesis de las ictiosis, también se están desarrollando nuevas estrategias de tratamiento para estas enfermedades<sup>287</sup>. La piel es el órgano más accesible para las terapias de transferencia genética de modo mínimamente invasivo<sup>288</sup>. La terapia génica *in vivo* consiste en la transferencia directa del gen terapéutico construido a la piel de los pacientes, de modo que la transformación celular tendría lugar dentro del paciente al que se administra la terapia. Por el contrario, en la terapia génica *ex vivo* la transformación celular se lleva a cabo en células o tejidos multiplicados en cultivo y luego se le transplantan al paciente las células ya transformadas.

En la IL, empleando transferencia génica *ex vivo*, se consiguió restaurar la expresión genética normal del gen *TGM1* y corregir la expresión fenotípica de la piel transplantada *in vivo* en la espalda de ratones inmunodeprimidos<sup>289,290</sup>. Recientemente también se ha conseguido, mediante transferencia correctiva génica, la recuperación fenotípica de queratinocitos cultivados derivados de pacientes con IA portadores de mutaciones en el gen *ABCA12*<sup>14</sup>.

Uno de los problemas potencialmente serios en la terapia génica es la reacción inmunitaria contra los productos transgénicos, especialmente en las enfermedades recesivas. La piel tiene unas características inmunológicas únicas, ya que contiene células de Langerhans, células dendríticas dérmicas y queratinocitos que secretan citoquinas inflamatorias, que son desfavorables para la expresión a largo plazo de un producto transgénico<sup>291</sup>. Esta respuesta

immune sería mayor en los pacientes con mutaciones nulas de ciertas proteínas, puesto que no tolerarían la nueva proteína sintetizada. Para evitarla sería necesario asociar un tratamiento inmunosupresor durante la terapia génica. Así, Ohyama *et al.*<sup>292</sup> inyectaron ADN de desmogleína 3 en ratones *knockout* para el gen que codifica esta proteína y observaron que el 50% de los animales inyectados desarrollaron anticuerpos IgG anti desmogleína 3. Esta producción de anticuerpos se prevenía con el uso concomitante de un inmunosupresor.



## 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO



Las ICAR son trastornos raros de la queratinización que se dividen clásicamente en IL y EIC. Su prevalencia estimada es de 1:200.000-300.000, aunque se han descrito prevalencias mayores en ciertas poblaciones, como la noruega (1:91.000), debido a la existencia de mutaciones fundadoras. Genéticamente las ICAR son muy heterogéneas. En los últimos años se han identificado mutaciones en los genes *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22* y *ABCA12* en los pacientes con este trastorno sin que se haya establecido una correlación fenotipo-genotipo estricta. Aunque muchos estudios han descrito mutaciones en estos genes en pacientes o familias con ICAR, pocos trabajos han analizado el espectro de mutaciones en poblaciones específicas. Disponemos de datos referentes a Estados Unidos, Egipto y Países Nórdicos (Finlandia, Noruega, Suecia y Estonia). Sin embargo, las características de los pacientes con ICAR en otras regiones de Europa, incluyendo España, no han sido investigadas.

Como hipótesis de trabajo se planteó el objetivo general de estudiar los pacientes con ICAR en Galicia. Los objetivos específicos fueron:

1. Identificar a todos los pacientes con ICAR de Galicia y estimar la prevalencia de esta enfermedad en nuestra población.
2. Definir las características clínicas de los pacientes afectados.
3. Caracterizar el espectro de mutaciones en los genes causales de ICAR en población gallega. Para ello, se realizará el análisis molecular de los genes *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22* en pacientes con esta enfermedad.
4. Clasificar las mutaciones de patogenicidad desconocida mediante estudios de ARN y aproximaciones bioinformáticas (estudios *in silico*, modelización molecular).
5. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo en los pacientes con ICAR de nuestra población.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se han estudiado dieciséis familias gallegas que englobaban a veinte miembros afectados de ICAR y a 47 familiares no afectos. Los pacientes fueron reclutados mediante el contacto con la Asociación Española de Pacientes con Ictiosis (ASIC) y a través del contacto con los Servicios de Dermatología de Galicia. Todos los pacientes y sus familiares consintieron en participar en el protocolo de este estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Santiago de Compostela. Incluía un examen clínico por dos dermatólogos (registrándose el tamaño, color y distribución de las escamas, la presencia de eritema, la afectación de palmas y plantas y la existencia de ectropion y alopecia), una historia médica general y dermatológica (antecedentes personales generales y dermatológicos, cirugías previas, tratamientos dermatológicos previos y actuales e historia de prematuridad y membrana colodión al nacimiento), la realización de fotografías clínicas y de biopsia cutánea y la extracción de muestras de sangre para el análisis de ADN. Cada una de las muestras utilizadas para este estudio cumple las exigencias de protección de datos personales que se establecen en el consentimiento informado vinculado a cada una de ellas.

El diagnóstico de los pacientes se basó en la revisión de sus historias médicas y en el examen clínico e histopatológico cuando no estaban realizando tratamiento con retinoides sistémicos. Para cada uno de ellos se realizó su correspondiente árbol genealógico, en el que se reflejó la historia familiar y la existencia de consanguinidad.

Los estudios poblacionales se realizaron en muestras de ADN pertenecientes a población gallega general.

### 3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Para cada uno de los pacientes estudiados se extrajeron 10ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA, el cual fue almacenado en nevera a 4°C hasta su extracción.

La extracción del ADN genómico (ADNg) se realizó a partir de sangre periférica mediante el protocolo de extracción mecánica con *Chemagic DNA Blood 100 Kit* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany). Esta técnica consta de fase de lisis y fase de purificación del ADN. Se utilizan partículas magnéticas que se unen a los ácidos nucleicos de la muestra. Mediante una barra metálica magnetizada que atrae a las partículas magnéticas se consigue la separación de los ácidos nucleicos (Fig. 21). El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante. El volumen de partida para nuestro análisis fue de 200 $\mu$ L de muestra y su rendimiento rondaba valores de 2-4 $\mu$ g de ADN. El ADN extraído de sangre periférica se conservó en nevera a 4°C hasta su análisis.

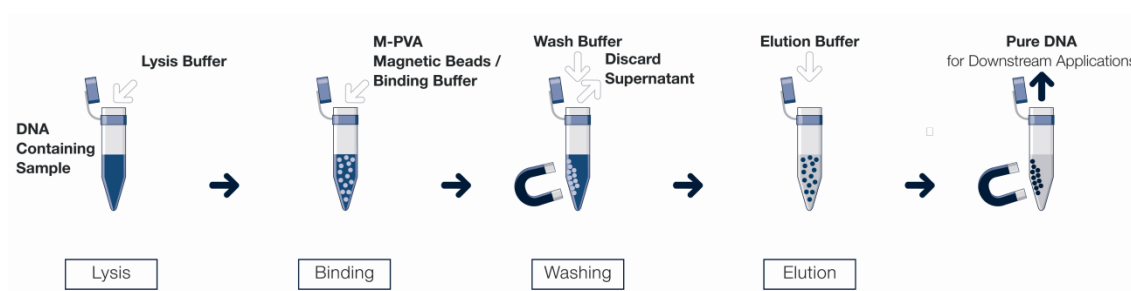


Figura 21. Extracción mecánica de ADNg mediante partículas magnéticas.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL ADN

La calidad y concentración de las muestras de ADN fueron determinadas con el espectrofotómetro *NanoDrop TM 1000*, que mide la absorbancia a las longitudes de onda del ultravioleta y la luz visible (220-750nm) con una alta reproducibilidad (Fig. 22). El rango de medida de concentración se establece entre 2-3700ng/ $\mu$ L (ADNs) y no necesita de una dilución previa de la muestra. Para realizar la medición se necesitan 1,5-2 $\mu$ L de muestra de ADN.

El *NanoDrop TM 1000* mide la absorbancia de la muestra a 230nm, 260nm y 280nm. La absorbancia del ADN es máxima a 260nm. La concentración de ADN en la muestra se calcula a partir del valor de la absorbancia a esa longitud de onda mediante la siguiente fórmula:

$$ADN (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (Abs_{260} \times FD \times 50)/1000$$

Donde:  $Abs_{260}$  es la absorbancia de la muestra a 260nm;  $FD$  es el factor de dilución de la muestra;  $50$  es el factor que indica que la absorbancia a 260nm es de 1,0 si se tiene una concentración de  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADNds y  $1000$  es el factor de conversión de mL a  $\mu\text{L}$ .

La absorbancia a 230nm (longitud de onda mínima de absorbancia del ADN) está influenciada por la cantidad de sales presentes en la muestra y a 280nm por la cantidad de proteínas. Por ello, atendiendo a las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 se puede establecer el grado de pureza de la muestra.

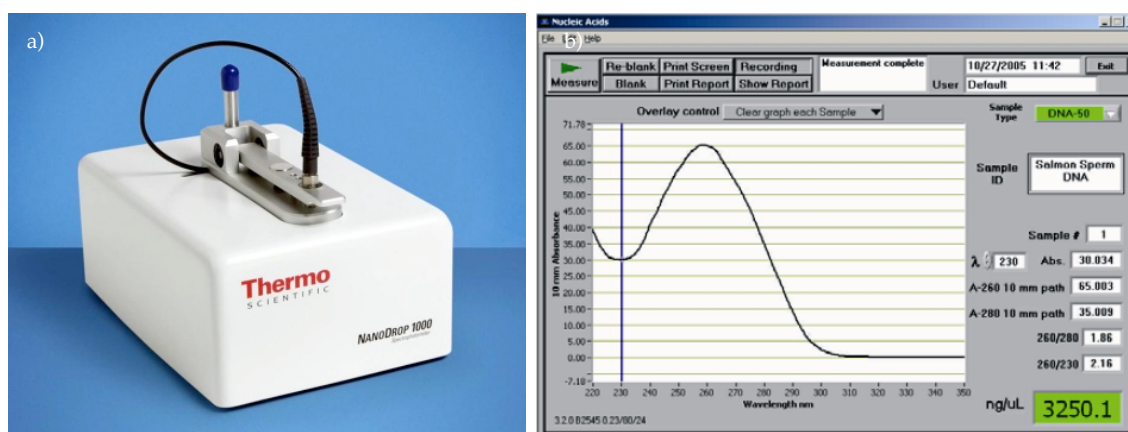


Figura 22. *NanoDrop TM 1000*. a) Equipo. b) Software.

### 3.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* Y *CYP4F22*

#### 3.4.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* Y *CYP4F22*

A partir del ADNg de sangre periférica se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22*. Utilizando el programa Primer3

(<http://frodo.wi.mit.edu/>) se diseñaron los *primers* específicos para la amplificación de los exones y las regiones intrónicas adyacentes de cada uno de los genes analizados (Anexos del I.1 al I.5).

Para todas las PCRs se utilizó un control negativo. Los termocicladores utilizados, indistintamente según su disponibilidad, fueron *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), *DNA Engine Dyad®* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y *TC-312 Techne Thermal Cycler*.

Las condiciones de amplificación de los genes *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22* se indican en la tabla 4. El protocolo de PCR y las condiciones de la misma son idénticos para todos los exones, tan solo variando la temperatura de *annealing* (Ta). El exón 1 del gen *ALOXE3* y el exón 6 del gen *NIPAL4* se han amplificado en 2 fragmentos solapantes.

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los genes estudiados.

Componentes	Volumen añadido	Concentración final
H <sub>2</sub> O MiliQ	5,5µL	
5x PCR <i>Buffer</i>	2,5µL	1x
dNTPs (5mM)	2µL	0,8mM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,75µL	1,5mM
<i>Primer forward</i> (10µM)	0,5µL	0,4µM
<i>Primer reverse</i> (10µM)	0,5µL	0,4µM
Taq Promega (5U/µL)	0,25µL	0,1U/µL
ADN (50ng)	1µL	
1 ciclo: 94°C 2 min		
40 ciclos: 94°C 30'', Ta °C 45'', 72°C 1,5 min		
1 ciclo: 72°C 7,5 min		

Ta=62°C para los exones 2, 5 y 6 del gen *TGM1*; Ta=64°C para el resto de exones del gen *TGM1*; Ta=60°C para todos los exones de los genes *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22*.

### 3.4.2. COMPROBACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Tras la amplificación se realizó la comprobación de los controles negativos en el bioanalizador Agilent (Technologies, Waldbronn, Germany) y del resto de los productos amplificados en geles de agarosa *E-Gel® 96 1% Agarose* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Una vez confirmados los correctos resultados de la PCR, los productos de PCR fueron purificados mediante un protocolo enzimático con *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). El *ExoSAP-IT* es un compuesto de dos enzimas hidrolíticas, la exonucleasa I recombinante y la fosfatasa alcalina de camarón (*Pandauls borealis*), formuladas en un *buffer* especial. La exonucleasa degrada los residuos monocatenarios de los *primers* o de cualquier otro ADN producido en la PCR mientras que la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTPs sobrantes de la mezcla de PCR (Fig. 23).

Las cantidades utilizadas fueron de 2,15 $\mu$ L de producto amplificado y 0,85 $\mu$ L de *ExoSAP-IT*. Para llevar a cabo la reacción, el termociclador mantiene la placa a 37°C durante 15 minutos (fase de tratamiento) y a 80°C otros 15 minutos (fase de inactivación). Los termocicladores utilizados para la purificación de las secuencias fueron los utilizados en los apartados anteriores.

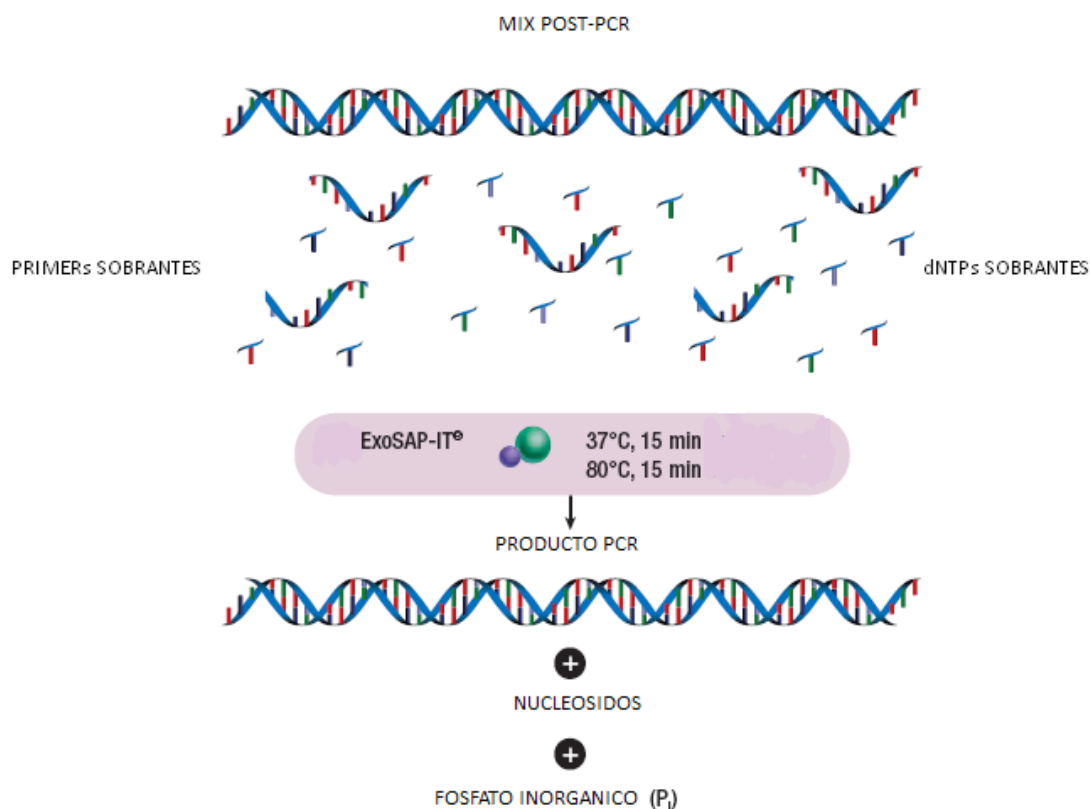


Figura 23. Purificación enzimática con *ExoSAP-IT*.

### 3.4.3. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN

La reacción de secuenciación se fundamenta en el método enzimático de Sanger. Se utilizan dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con distintos fluorocromos que van a permitir que el secuenciador automático determine la secuencia del gen. El *BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) permite llevar a cabo la reacción en un solo pocillo en el que se añaden los cuatro terminadores marcados. La secuenciación se realizó en sentido *forward* y *reverse*. En cada pocillo se añadieron: 1µL de *primer* (Anexos del I.1 al I.5), 5,5µL de agua *nuclease free*, 2,5µL de *BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer 5x* y 0,5µL de *BigDye Terminator v3.1*. Las condiciones para la reacción fueron: un ciclo a 96°C durante 1 minuto, 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10'', *anealing* a 50°C durante 5'' y extensión a 60°C durante 4 minutos. Los termocicladores utilizados fueron los ya descritos.

### 3.4.4. ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE DATOS

Los productos de secuenciación fueron separados mediante una electroforesis capilar utilizando el *ABI3730XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), un secuenciador de 96 capilares que funciona de manera totalmente automática inyectando las muestras en el capilar previamente cargado con el polímero (*POP-7*) que funciona como gel de secuencia. Esto permite separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. El láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida por cada cadena de ADN fluorescente y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.

Para el análisis de las secuencias se utilizó el *software* Staden Package 2003.Ob1, en concreto los programas Pregap4 y Gap4, que mediante la utilización de algoritmos matemáticos facilitan el manejo de las secuencias procedentes del secuenciador permitiendo su alineamiento automático y posterior análisis (Fig. 24). Este programa compara base a base la secuencia alineada y su correspondiente secuencia de referencia del GenBank. Para *TGM1* se utilizó la secuencia NM\_000359.2, para *ALOX12B* la NM\_001139.2, para *ALOXE3* la NM\_021628.2, para *NIPAL4* la NM\_001099287.1 y para *CYP4F22* la NM\_173483.3. Cada una de las mutaciones localizadas ha sido comprobada con una segunda extracción de ADN, amplificación y secuenciación bidireccional.

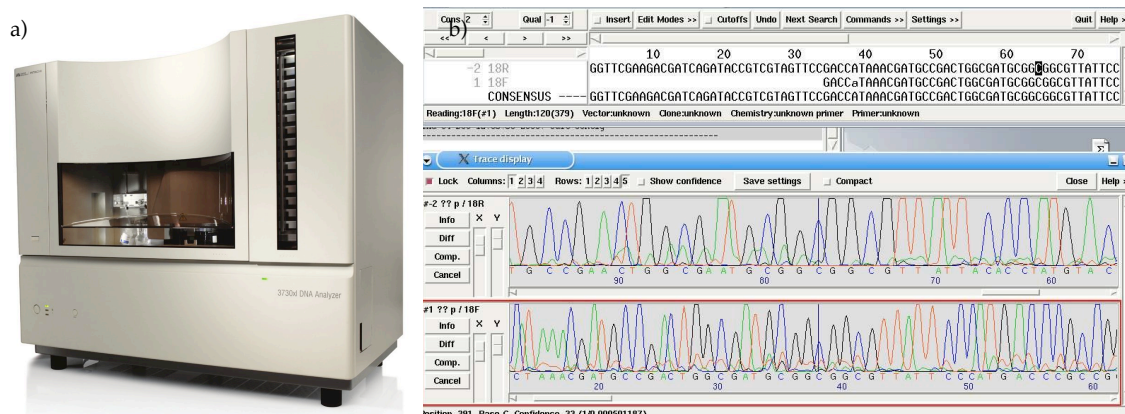


Figura 24. a) Secuenciador ABI3730XL. b) Software Staden Package.

### 3.5. ESTUDIOS *IN SILICO*

#### 3.5.1. ESTUDIO DE VARIANTES *MISSENSE*

Para el estudio de las variantes *missense* se empleó el software Alamut v1.4 ([http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/whatx\\_new/v1.4.html](http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/whatx_new/v1.4.html)), que a su vez emplea diferentes herramientas bioinformáticas para la predicción *in silico*. Estas herramientas se basan en el grado de conservación aminoacídica entre las distintas especies, la afectación de la estructura y la función proteica y la posible interrupción de los elementos *cis* exónicos implicados en la regulación del *splicing*.

Para los estudios *in silico* del gen *TGM1* se utilizaron las secuencias de las especies:

1. *Homo sapiens*.
2. *Pan troglodytes* (chimpancé).
3. *Macaca mulatta* (macaco Rhesus).
4. *Rattus norvegicus* (rata).
5. *Mus musculus* (ratón).
6. *Oryctolagus cuniculus* (conejo).
7. *Canis familiaris* (perro).
8. *Felis catus* (gato).
9. *Bos Taurus* (toro)
10. *Dasypus novemcinctus* (armadillo).
11. *Monodelphis domestica* (colicorto).
12. *Xenopus tropicalis* (rana).
13. *Tetraodon nigroviridis* (pez globo).
14. *Takifugu rubripes* (pez fugu)
15. *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta).

Para los estudios *in silico* del gen *ALOXE3* se utilizaron las secuencias de las siguientes especies:

1. *Homo sapiens*.
2. *Pan troglodytes* (chimpancé).
3. *Macaca mulatta* (macaco Rhesus).
4. *Rattus norvegicus* (rata).
5. *Mus musculus* (ratón).
6. *Oryctolagus cuniculus* (conejo).
7. *Canis familiaris* (perro).
8. *Felis catus* (gato).
9. *Bos Taurus* (toro).
10. *Dasypus novemcinctus* (armadillo).
11. *Monodelphis domestica* (colicorto).
12. *Gallus gallus* (gallo).
13. *Xenopus tropicalis* (rana).
14. *Tetraodon nigroviridis* (pez globo).
15. *Takifugu rubripes* (pez fugu).
16. *Danio rerio* (pez cebra).
17. *Ciona savignyi* (alga).

Las herramientas bioinformáticas utilizadas fueron:

1. Align GVGD (<http://agvgd.iarc.fr>). Este programa, atendiendo a las características biofísicas de los aminoácidos (composición, polaridad y volumen) y la realización de alineamientos múltiples entre especies, establece un *score* que predice el impacto del cambio aminoacídico en la proteína y por tanto, el grado de patogenicidad (deletérea o neutra) de las sustituciones *missense*<sup>293</sup>. Es una extensión de la diferencia de Grantham original<sup>294</sup>. Así, según el *score* se establecen rangos que estiman la patogenicidad de la variante: siendo el  $C_0$  la de menor probabilidad de patogenicidad y el  $C_{65}$  la de mayor probabilidad de patogenicidad (Tabla 5).

Tabla 5. Scores del programa Align GVGD.

Score	Predicción
$GD \geq 65 + \tan(10) \times (GV^{2.5}) \rightarrow$ Clase C65	Más probable
$GD \geq 55 + \tan(10) \times (GV^{2.0}) \rightarrow$ Clase C55	
$GD \geq 45 + \tan(15) \times (GV^{1.7}) \rightarrow$ Clase C45	
$GD \geq 35 + \tan(50) \times (GV^{1.1}) \rightarrow$ Clase C35	
$GD \geq 25 + \tan(55) \times (GV^{0.95}) \rightarrow$ Clase C25	
$GD \geq 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6}) \rightarrow$ Clase C15	
$(GD < 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6}) \rightarrow$ Clase C0	Menos probable

2. PolyPhen-2 versión v2.0.23 (*Prediction of Funtional Effect of Human SNPs*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>). La predicción del grado de patogenicidad se basa en la realización de tres tipos de aproximaciones: caracterización de la secuencia donde se produce la sustitución, grado de conservación de la sustitución proteica y posible alteración de la estructura tridimensional de la proteína. Atendiendo a estas predicciones establece las siguientes clasificaciones:

- a) Probablemente dañina: Alta probabilidad de patogenicidad por afectar a la estructura o función proteica.
- b) Posiblemente dañina: Se supone que la sustitución aminoacídica puede afectar a la función o estructura proteica.
- c) Benigna: Alta probabilidad de que no tenga ningún efecto deletéreo.
- d) Incierto: Cuando no existen datos suficientes para que el programa realice una predicción.

3. SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>). Este algoritmo permite conocer los posibles efectos de una sustitución aminoacídica en base a la homología entre secuencias y las propiedades físicas de los aminoácidos. Parte de la premisa de que la evolución de la proteína se correlaciona con su función. Así, las posiciones importantes para la función deberían estar conservadas en un alineamiento de la familia proteica. El programa busca secuencias similares, las alinea y posteriormente calcula los *scores* en base a los diferentes aminoácidos que aparecen en cada posición proporcionando el resultado de si afecta o no a la función de la proteína. Los *scores* que aporta se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. *Scores* del programa SIFT.

<i>Scores</i>	Descripción
SIFT <i>score</i>	Valores de 0 a 1. Se predice que la sustitución aminoacídica es dañina si el <i>score</i> es $\leq 0,05$ y tolerada si es $> 0,05$ .
Conservación de la secuencia	Valores de 0 a 4,32. Idealmente el número estaría entre 2,75 y 3,5. Mide la diversidad de las secuencias usadas. Si el valor es mayor de 3,25 indica que la predicción se basó en secuencias relacionadas de forma estrecha.
Secuencias representadas en esa posición	Es el número de secuencias que tienen un aminoácido en la posición de la predicción. SIFT selecciona automáticamente la secuencia, pero si la sustitución está situada al comienzo o al final de la proteína, podría haber solo unas pocas secuencias representadas en esa posición.

### 3.5.2. ESTUDIO DE VARIANTES DE *SPLICING*

Se utilizó el *software* Human Splicing Finder (HSF) v2.4 que es una herramienta *online* gratuita ([www.umd.be/HSF](http://www.umd.be/HSF)) que predice el efecto de los cambios del ADN en las señales de *splicing* y que identifica motivos de *splicing* en cualquier secuencia humana. Para ello, utiliza diferentes algoritmos, como el HSF y el MaxEnt Scan<sup>295,296</sup>. Además, incorpora otros algoritmos ya descritos para la identificación de elementos activadores del *splicing* como son RESCUE-ESE<sup>297</sup> y ESE-Finder<sup>298</sup>. Para permitir el estudio de cualquier secuencia humana, HSF incluye todos los genes y transcritos alternativos, así como las secuencias intrónicas extraídas de la base de datos Ensembl Human Genome<sup>299</sup>.

## 3.6. ESTUDIOS DE ADNc

### 3.6.1. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción del ARN se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica con *RNeasy*<sup>®</sup> *Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) (Fig. 25a). Esta purificación necesita un pretratamiento y homogenización de la muestra que consiste en la lisis celular con *Buffer* RLT seguida de la extracción de ARN en columnas de sílica (Qiagen *RNeasy*<sup>®</sup> *Maxi Columns*) capaces de aislar hasta 100µg de ARN. El protocolo de extracción fue el indicado por el fabricante.

El ARN ligado a la columna *RNeasy* fue tratado con DNasa I (*RNase-Free DNase Set*) para eliminar pequeñas cantidades restantes de ADN. El volumen final de ARN obtenido fue de 30µL. La conservación se realizó a -80°C.

### 3.6.2. SÍNTESIS DE ADNc

El ADNc fue analizado para la caracterización de la mutación c.984+1G>A en el gen *TGM1*. La síntesis de ADNc se basó en la realización de la RT-PCR utilizando la transcriptasa

reversa *SuperScript™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que permite conseguir ADNc de hasta 10kb a partir de ARN (Fig. 25b y 25c). Una vez obtenido el ADNc, se amplificó la zona de interés con un *primer forward* localizado entre el final del exón 5 y el comienzo del exón 6 (ACCTGGAACACTACGGCCAGTTTGAC) y un *primer reverse* localizado en el exón 8 (GCTAGTCTCTTGGGGTGTGGCATCC) (Fig. 25d). Posteriormente, para evitar los transcritos  $\Delta$ exón7 se empleó un *primer* interno en el exón 7 (CGGAATATCCCGTGCGTAGGT). Los termocicladores utilizados fueron los anteriormente descritos para otras técnicas. Para la optimización y realización de las PCRs siempre se utilizó un control negativo.

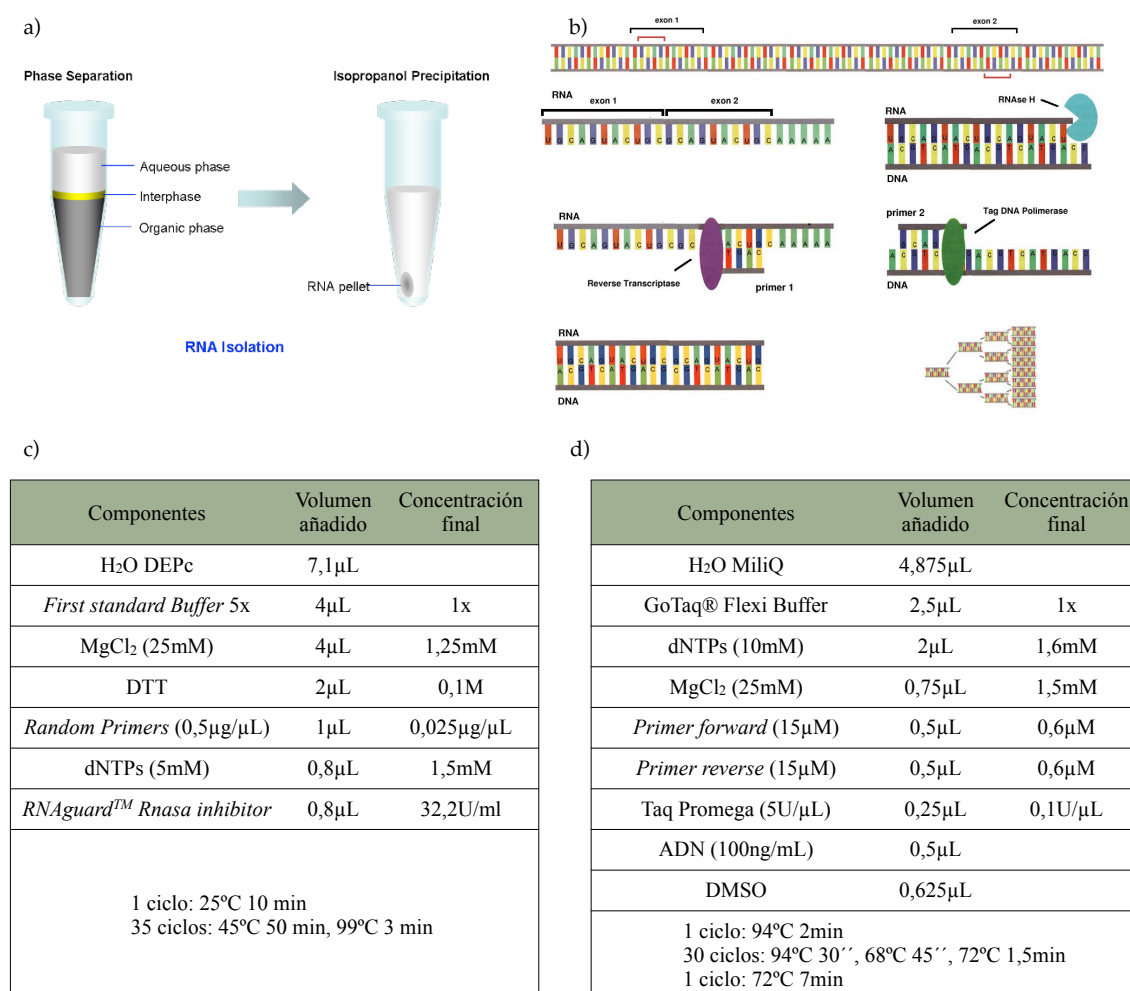


Figura 25. Estudios de ADNc. a) Extracción de ARN. b) y c) Síntesis de ADNc. d) Condiciones de la amplificación del ADNc para la caracterización de la mutación c.984+1G>A.

### 3.6.3. SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Los productos RT-PCR obtenidos fueron purificados, secuenciados y analizados según los procedimientos anteriormente descritos para ADNg. Para el análisis de las secuencias se utilizó el *software* Staden Package 2003.Ob1. La secuencia de referencia GenBank para *TGM1* utilizada fue la NM\_000359.2.

### 3.7. MODELIZACIÓN MOLECULAR

Las estructuras moleculares del *TGM1* y del *ALOXE3* no se conocen. Por ello, el factor de coagulación humano XIIIa, una *TGasa* de estructura conocida (molde 1ex0.pdb), se ha usado para modelar el *TGM1*, de acuerdo con Herman *et al.*<sup>166</sup> y la 15-LOX de conejo (molde 2P0M.pdb) se usó para modelar el *ALOXE3*, como en Eckl *et al.*<sup>155</sup>.

Los moldes comparten un 38,5% de identidades con los aminoácidos del 72 al 791 del *TGM1* (NP\_000350.1) y un 36% de las identidades con los aminoácidos del dos al 663 del *ALOXE3* (NP\_067641.2), mediante el programa de modelización ESyPred3D<sup>300</sup>.

El programa Swiss-Pdb Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv>) fue utilizado para visualizar las proteínas modeladas. Los puentes de hidrógeno entre diferentes grupos se establecieron en base al tipo de átomo, el ángulo y la distancia y se detectaron cuando la distancia entre el dador y el aceptor era de 2,35 a 3,2 Å. Los puentes de hidrógeno que estaban en este rango de distancias se dibujaron como líneas verdes punteadas, los puentes de hidrógeno más débiles (fuera de la distancia permitida: 0,05 Å por defecto) se señalaron en gris.

### 3.8. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Las secuencias de ADN de distintos individuos son casi idénticas. Sin embargo, aproximadamente cada 200-300 pares de bases del genoma, pueden aparecer variaciones tanto puntuales como de longitud que se conocen como polimorfismos. La variabilidad de estos polimorfismos hace que se consideren marcadores genéticos, es decir, segmentos de ADN con ubicación física determinada en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. A cada una de las secuencias alternativas que puede presentar el marcador se la conoce como alelo.

Los marcadores genéticos más frecuentemente utilizados son los microsatélites y los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

- **Microsatélites.** Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN en las cuales el número de bases que se repiten varían de una hasta seis, generando alelos de distintos tamaños. Estos marcadores comenzaron a utilizarse tras la introducción de la PCR en 1988, y son los sistemas de elección en el mapeo de genes, genética de poblaciones e identificación humana.
- **SNPs.** Los SNPs son polimorfismos de un único nucleótido, es decir, variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base. Los SNPs autosómicos son marcadores de elección por su estabilidad, distribución y rango completo de frecuencias alélicas entre poblaciones. Son ampliamente utilizados en estudios de asociación de enfermedades complejas, genética de poblaciones y genética evolutiva.

Los marcadores genéticos próximos entre sí tienden a heredarse en bloque debido a que están ligados o en alto desequilibrio de ligamiento. La combinación de estos marcadores ligados se la conoce como haplotipo.

Para conocer el mapa de haplotipos del genoma humano se creó, a finales del año 2002, el proyecto internacional HapMap, que genotipa millones de SNPs en diferentes grupos poblacionales humanos (África, Asia y Europa). La información obtenida por HapMap es

cedida a la comunidad científica con el objetivo de facilitar la investigación y el desarrollo de fármacos contra diversas enfermedades.

Conocer la organización de los bloques haplotípicos del genoma humano nos permite reducir el número de marcadores a estudiar en un análisis concreto, ya que al encontrarse éstos marcadores asociados, con estudiar unos pocos tendríamos la información de todo el bloque. Los SNPs que representan a toda una región se conocen como *tag* SNPs. Así, seleccionando los *tag* SNPs de una determinada región podríamos predecir cualquier otro SNP dentro del bloque considerado.

Una de las aplicaciones del estudio de haplotipos en la genética clínica es que nos permite determinar si la mutación que ocurre en un gen y origina una enfermedad se ha producido en un momento determinado de la historia y después ha pasado de generación en generación (mutación fundadora) o ha aparecido porque la región del genoma en donde se encuentra presenta una secuencia de ADN propensa a mutar (mutación *hotspot*).

Los individuos que presentan mutaciones *hotspots* no suelen estar relacionados. En los individuos que presentan mutaciones fundadoras, el estudio de haplotipos proporciona información sobre su origen y permite seguir el rastro de las poblaciones humanas. Para conocer la edad de las mutaciones fundadoras se considera que:

- la longitud del haplotipo original disminuye con el tiempo,
- el haplotipo original corresponde al cromosoma completo que aloja la mutación,
- el individuo fundador transmite ese cromosoma a la descendencia,
- los dos cromosomas (uno de cada progenitor) intercambian entre sí de forma aleatoria segmentos de ADN,
- una mutación fundadora joven se encontraría en medio de un haplotipo largo,
- una mutación fundadora antigua se hallaría en un haplotipo de longitud reducida.

### 3.8.1. ESTUDIO DE SNPs

#### 3.8.1.1. SELECCIÓN DE SNPs

Para seleccionar los SNPs a genotipar, se extrajo la información de los mismos de la base de datos del proyecto HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Se seleccionaron los SNPs del gen *TGM1* y de 10kb a cada lado del mismo. Así, para la población CEU, se obtuvieron 28 SNPs (Fig. 26a). Ocho de estos SNPs habían sido identificados en nuestros pacientes al realizar el estudio de secuenciación (rs2229463, rs2273301, rs1126432, rs2229464, rs2273303, rs7147300, rs8193032, rs2855009). Mediante el *software* Haploview v.4.<sup>301</sup>, se seleccionaron los *tag* SNPs, forzando la inclusión de los ocho anteriores. En total fueron seleccionados diecinueve SNPs (rs6573653, rs2281473, rs2180196, rs7151201, rs941504, rs2748525, rs1950494, rs7158744, rs14193, rs3742506, rs17256811, rs2229463, rs2273301, rs1126432, rs2229464, rs2273303, rs7147300, rs8193032, rs2855009) (Fig. 26b) a los que se sumaron tres polimorfismos más (rs3814813, rs3814814 y rs2273302), para los cuales no había datos de frecuencia en población CEU pero sí en población gallega.

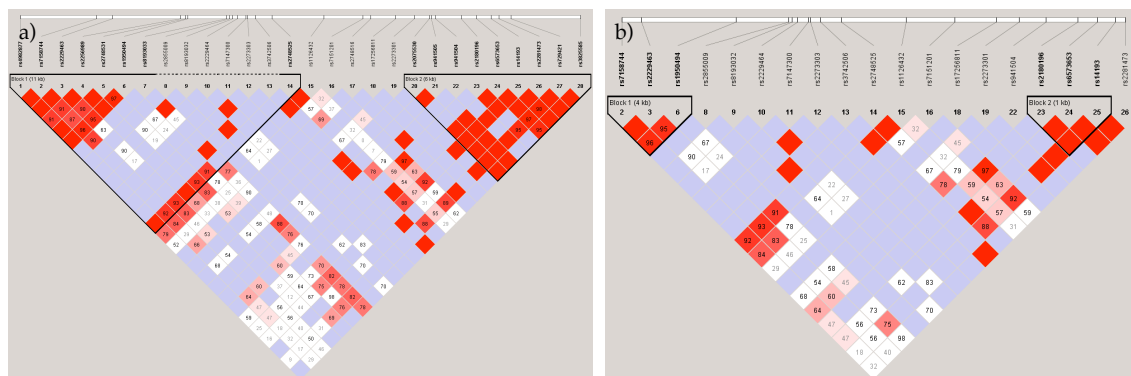


Figura 26. Datos de HapMap. a) SNPs en la zona de interés en población CEU. b) *Tag* SNPs seleccionados en población CEU.

#### 3.8.1.2. GENOTIPADO DE SNPs

Se utilizaron quince pares de *primers* que amplifican regiones del ADN que contienen de uno a cinco de los SNPs de interés, de modo que las regiones amplificadas sirvieran luego de molde para las sondas empleadas en la minisequenciación. Estos *primers* se diseñaron en función de su temperatura de hibridación y de la longitud del amplicón resultante y fueron evaluados mediante los programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y AutoDimer (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/NIJ/AutoDimer.htm>). Los *primers* a utilizar se

distribuyeron en dos multiplexes (Anexo I.6), cada uno de los cuales englobó once SNPs. El protocolo de amplificación de ambos multiplexes se recoge en la tabla 7).

Tras la amplificación se llevó a cabo una comprobación de los resultados mediante las técnicas antes descritas. A continuación se realizó la purificación mediante la adición de 0,5 $\mu$ L de *ExoSap-IT* a 1 $\mu$ L de producto amplificado, y se sometió a 37°C durante 60 minutos seguido de otra fase a 75°C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

Una vez amplificados los fragmentos se llevó a cabo la reacción de minisequenciación utilizando el kit comercial de SNaPshot®. El SNaPshot es un método de genotipado que combina la minisequenciación con la detección mediante fluorescencia<sup>302</sup>. El protocolo empleado y los *primers* utilizados se detallan en la tabla 7 y en el anexo I.7, respectivamente. Los ddNTPs fluorescentes restantes se inactivaron mediante la adición de 0,5 $\mu$ L de fosfatasa alcalina, SAP (Amersham Biosciences). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos seguido de 15 minutos a 85°C.

A continuación se añadieron a 1 $\mu$ L de la mezcla resultante 9,53  $\mu$ L de Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 0,48 $\mu$ L de marcador interno LIZ-120 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Las sondas marcadas fluorescentemente fueron separadas mediante electroforesis capilar en el secuenciador ABI3730XL (polímero POP-7). Los datos se procesaron con el *software* GeneMapper v4.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) (Fig. 27).

Tabla 7. Protocolo de amplificación de los multiplexes (izquierda). Protocolo del SNaPshot (derecha).

Componentes	Volumen añadido	Componentes	Volumen añadido
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 2x	5 $\mu$ L	SNaPshot Multiplex <i>Ready Reaction Mix</i>	2,5 $\mu$ L
Mix de <i>primers</i> (2 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	Mix de sondas (2 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O MiliQ	3,5 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O MiliQ	0,5 $\mu$ L
ADN	0,5 $\mu$ L	Producto del <i>ExoSap-IT</i>	1,5 $\mu$ L
1 ciclo: 95°C 15 min 40 ciclos: 94°C 30'', 70°C 3 min, 72°C 1,5 min 1 ciclo: 68°C 15 min		25 ciclos: 96°C 10'', 50°C 5'', 60°C 30''	

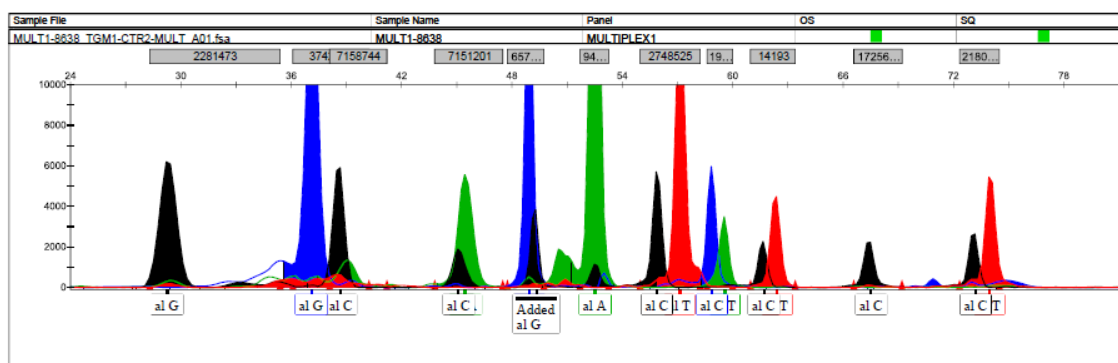


Figura 27. Resultados de SNaPshot procesados con el *software* GeneMapper v4.0.

### 3.8.2. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES

#### 3.8.2.1. SELECCIÓN DE MICROSATÉLITES

Puesto que los portadores de las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227delACACA y c.984+1G>A compartían un haplotipo común en la zona estudiada con los SNPs, la región genotipada en el cromosoma 14q11 se extendió a 12Mb usando ocho marcadores polimórficos microsatélites (Anexo I.8). Los microsatélites seleccionados fueron los descritos previamente en la literatura (D14S64, D14S1032, D14S581, D14S275, D14S264, D14S72, D14S043 y D14S742) 133,167,173. Para incrementar la región evaluada, a través de MapViewer ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview)), se incorporaron los microsatélites D14S1042 y D14S1060. La información de los microsatélites se obtuvo de la base de datos UniSTS ([www.ncbi.nlm.nih.gov/unists](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists)).

#### 3.8.2.2. GENOTIPADO DE MICROSATÉLITES

Los *primers forward* de PCR se marcaron con los fluoróforos FAM o HEX (Sigma-Genosys Ltd. Cambridgeshire, UK). Los multiplexes fueron analizados siguiendo el protocolo de amplificación que se recoge en la tabla 8.

Los productos de amplificación de los multiplexes fueron separados en el ABI3730XL y el análisis de fragmentos se realizó con el *software* GeneMapper v4.0 (Fig. 28).

Tabla 8. Protocolo de amplificación de los multiplexes para el estudio de microsatélites.

Componentes	Volumen añadido
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 2x	5 $\mu$ L
Mix de primers (2 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O MiliQ	3 $\mu$ L
ADN	1 $\mu$ L
1 ciclo: 95°C 15 min 40 ciclos: 94°C 30", 64°C 3min, 72°C 1,3min 1 ciclo: 68°C 15min	

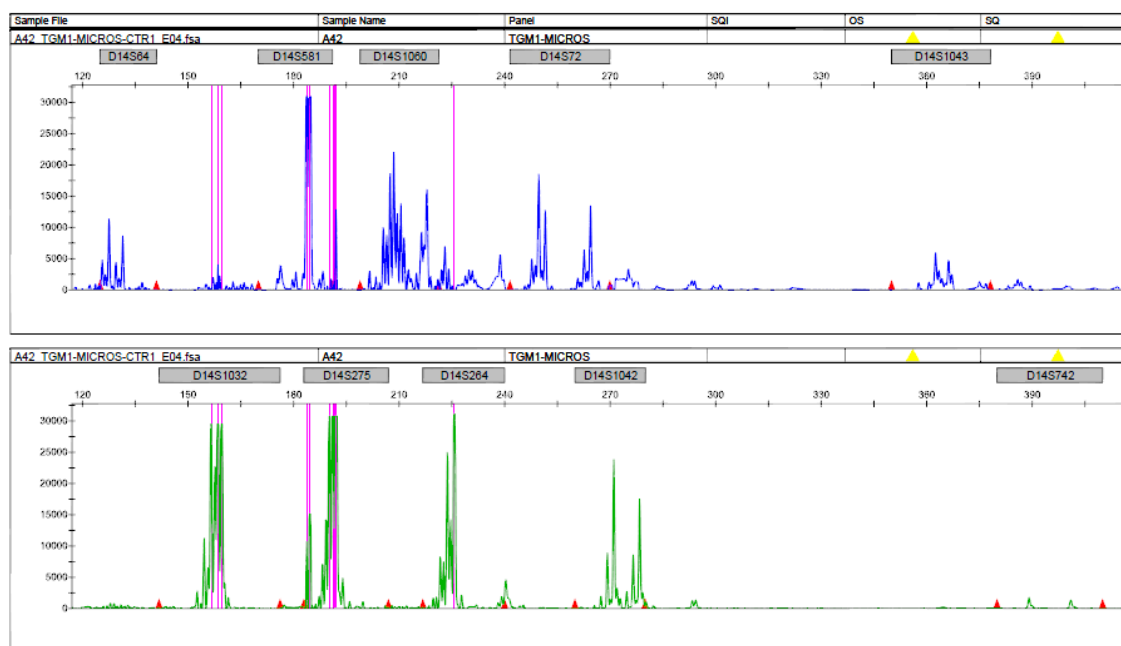


Figura 28. Resultados del estudio de microsatélites procesados con el *software* GeneMapper v4.0.

### 3.8.3. RECONSTRUCCIÓN DE HAPLOTIPOS

Para la reconstrucción de haplotipos se utilizó el *software* PHASE v2.1<sup>303,304</sup>. Este programa implementa el método estadístico bayesiano para reconstruir los haplotipos desde los datos de genotipado de la población. Utiliza SNPs, microsatélites y otros *loci* multialélicos, de forma aislada o en combinación, y permite que existan datos perdidos.

En nuestro caso, la información de los SNPs y microsatélites genotipados se utilizó para asignar la fase alélica en las familias, desde los datos de los tríos, y en los 100 individuos control. Los haplotipos del paciente fallecido de la Familia 17 fueron inferidos de los datos de sus padres y su hermano. Los cromosomas en fase de los familiares de los pacientes se usaron

para estimar las fases de la población control. Los resultados fueron revisados manualmente asumiendo el menor número posible de recombinaciones.

### 3.8.4. DATACIÓN DEL ORIGEN DE LAS MUTACIONES FUNDADORAS EN EL GEN *TGM1*

Para estimar el número de generaciones transcurridas desde el antepasado común más reciente (ACMR) se utilizaron dos métodos basados en el desequilibrio de ligamiento, los estimadores de Bergman<sup>305</sup> y de Risch<sup>306</sup>. Para calcular el tiempo desde la aparición de la mutación, se empleó el método Bayesiano implementado con el *software* DMLE+ v2.3<sup>307</sup>.

- **Estimador de Bergman**<sup>305</sup>. Deriva del trabajo previo de Sham<sup>308</sup>. Asume que el cromosoma ancestral común que contiene la mutación fundadora también contiene el marcador analizado. La fracción de recombinación entre el *locus* de la mutación y el del marcador se denomina  $r$ . El número de generaciones,  $t$ , se puede estimar por:

$$t = \frac{\ln\left(\frac{p_{d1} - p_{n1}}{1 - p_{n1}}\right)}{\ln(1 - r)}$$

Donde  $p_{d1}$  es la frecuencia del alelo fundador en el microsatélite analizado en la población afecta y  $p_{n1}$  es la frecuencia del mismo en la población normal.  $p_{d1}$  se puede estimar dividiendo el número de individuos que portan el alelo ancestral en la población afecta dividido por el total de individuos afectados,  $n_d$ , ( $p_{d1}=n_{d1}/n_d$ ).

Una limitación del método de Bergman es que no es aplicable para todos los microsatélites disponibles. Los que están situados en la zona de haplotipo conservado generan un valor de  $p_{d1}$  igual a 1 y por tanto una  $t$  igual a 0. Además, los alelos fundadores cuya frecuencia es mayor en el grupo afecto que en población control conducen a un logaritmo de un número negativo. Por ello, la fórmula solo se puede emplear si  $p_{d1} > p_{n1}$ .

- **Estimador de Risch**<sup>306</sup>. Aplica la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\log\left(\frac{1 - p_{n1} - Q}{1 - p_{n1}}\right)}{\log(1 - r)}$$

Donde  $Q=1-p_{d1}$  representa la frecuencia de cromosomas con la mutación que no portan el alelo fundador.

Esta fórmula solo es aplicable al *locus* más cercano a la mutación. Para un segundo microsatélite, de acuerdo con Risch, se consideran solo los cromosomas con la mutación que portan el alelo fundador en el microsatélite previamente analizado y se determina la proporción de éstos que no portan el alelo fundador en el segundo microsatélite. Esta proporción es sustituida por  $Q$  en la fórmula. La fracción de recombinación se calcula ahora entre el primer y el segundo *locus*.

Tanto la fórmula de Bergman como la de Risch asumen que la población control es estable, es decir, que la frecuencia alélica no cambia de generación a generación.

Labuda *et al.*<sup>309</sup> en 1997 encontraron discrepancias entre los datos demográficos y genéticos en la población original del artículo de Risch. El incremento de la frecuencia de la mutación desde su aparición era demasiado grande como para ser explicado únicamente por un mecanismo de selección social. Por ello, propusieron un factor de corrección,  $g_0$ , que se sumaría al número de generaciones estimadas por la ecuación de Risch.

$$g_0 = -\frac{1}{p} \ln(rf_d)$$

Donde  $f_d = e^p / (e^p - 1)$  y  $p$  es la tasa de crecimiento poblacional.

Este factor de corrección tiene en cuenta la tasa de crecimiento poblacional  $p$ , la cual fue estimada de la ecuación  $N = N_0 e^{gp}$ , donde  $N$  es el tamaño estimado de la población actual,  $N_0$  es el tamaño estimado de la población en el momento de referencia y  $g$  es el número de generaciones entre esos dos momentos.

- **Software DMLE+ v2.3.** Es una extensión del método Bayesiano de Rannala y Reeve<sup>307</sup>. Este programa fue inicialmente diseñado para el mapeo de alta resolución de mutaciones causantes de enfermedades basándose en el desequilibrio de ligamiento observado entre la mutación y los marcadores relacionados. Utiliza el método de Markov de cadenas de Monte Carlo (MCMC) para generar la densidad de probabilidad posterior de la edad mutacional, basándose en los haplotipos observados en cromosomas normales y afectados, en la distancia en el mapa entre el sitio de la mutación y los marcadores, en la fracción de cromosomas mutados muestreados y en la tasa de crecimiento poblacional estimada.

### 3.9. ESTUDIOS EN POBLACIÓN CONTROL

Con el fin de estimar la frecuencia de las mutaciones *missense* descritas en este estudio se genotiparon las mismas mutaciones en 100 individuos de la población general. Los *primers*, protocolo de PCR y condiciones utilizadas fueron las del exón y gen correspondiente y han sido descritas en apartados anteriores. Para el estudio de haplotipos y datación de las mutaciones fundadoras también se analizaron 100 individuos de la población general.

### 3.10. NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES

La nomenclatura de las distintas mutaciones sigue la normativa propuesta por la HGSV<sup>310</sup>. Como secuencias de referencia se utilizaron las de los ARNm y proteínas codificadas por los genes *TGM1* (NM\_000359.2 y NP\_000350.1), *ALOX12B* (NM\_001139.2 y NP\_001130.1), *ALOXE3* (NM\_021628.2 y NP\_067641.2), *NIPAL4* (NM\_001099287.1 y NP\_001092757.1) y *CYP4F22* (NM\_173483.3 y NP\_775754.2).

### 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test exacto de Fisher se utilizó para comparar las características clínicas entre portadores y no portadores de mutaciones bialélicas en el gen *TGM1*. Los valores de *p* se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni para test múltiples. El paquete estadístico R (<http://www.r-project.org/>) fue empleado para llevar a cabo el análisis estadístico.



## 4. RESULTADOS

---



#### 4.1. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

A través del contacto con los Servicios de Dermatología de Galicia y con la ASIC se identificaron 23 pacientes con ICAR en Galicia. Veinte de los pacientes, que pertenecían a dieciséis familias, aceptaron participar en este estudio. Dos de las familias estudiadas presentaban consanguinidad (Familias 13 y 14) (Ver Fig. 40, 41). En los demás casos, el estudio genealógico no detectó antepasados comunes ni consanguinidad en las últimas cuatro generaciones.

La mayoría de las familias procedían de la zona costera de las Rías Baixas. En concreto, siete de ellas eran originarias de la península del Morrazo y residían actualmente en esa zona. El resto procedían de Ribeira, Gondomar, Cambados y Valga. Otros pacientes pertenecían a los ayuntamientos de Ferrol, Otero de Rei, Viana do Bolo y Allariz. En la imagen siguiente se sitúan geográficamente las familias según el lugar de nacimiento de los padres (Fig. 29).

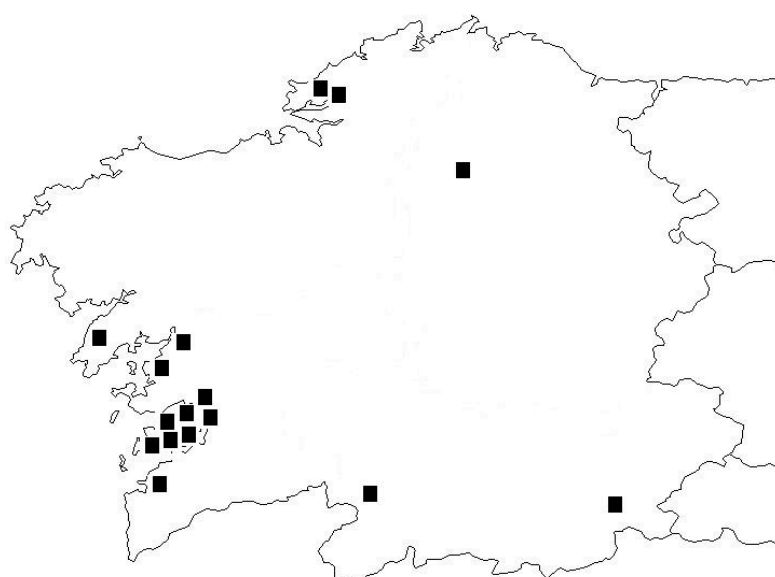


Figura 29. Origen geográfico de las dieciséis familias gallegas con ICAR estudiadas.

Teniendo en cuenta las cifras de población recogidas por el Instituto Nacional de Estadística ([http://www.ine.es/inebmenu/mnu\\_cifraspop.htm](http://www.ine.es/inebmenu/mnu_cifraspop.htm)) a uno de enero de 2009, estimamos la prevalencia global de ICAR en Galicia en 1:122.000. Si considerásemos la zona costera de las Rías Baixas, de donde son originarias la mayoría de las familias, la prevalencia aumentaría hasta 1:33.000. Incluyendo solo los pacientes estudiados la prevalencia sería de 1:138.000 en Galicia y 1:50.000 en la zona costera.

Los pacientes incluidos en este estudio fueron seis hombres y catorce mujeres. La edad media en el momento del estudio fue de 30,85 años, con un rango entre uno y 84 años. Atendiendo a sus características clínicas y a la revisión de sus historias clínicas, diecisiete (85%) pacientes se categorizaron clínicamente como IL y tres (15%) como EIC. Catorce (70%) habían nacido como bebés colodión. Once pacientes (55%) con IL habían sido prematuros, mientras que todos los pacientes con EIC habían nacido a término. Se observaron escamas de tipo laminar en dieciséis de los diecisiete pacientes con IL. Un paciente con IL y los tres con EIC presentaban descamación fina. Las escamas eran marronáceas en once pacientes y blanquecinas en los nueve restantes. Se observó eritema generalizado en cuatro (20%) casos, dos de ellos con IL. Dieciséis (80%) pacientes presentaron ectropion y trece (65%) alopecia. La hiperqueratosis palmoplantar estaba presente en diecisiete (85%) casos. Se había realizado tratamiento con retinoides sistémicos en once (55%) pacientes. Las características clínicas de los pacientes están recogidas en las figuras 30-39 y en la tabla 9.



Figura 30. Características clínicas del paciente 1.II.1. Membrana colodión al nacimiento (izquierda). Ectropion y descamación blanquecina laminar a los pocos meses de vida (derecha).

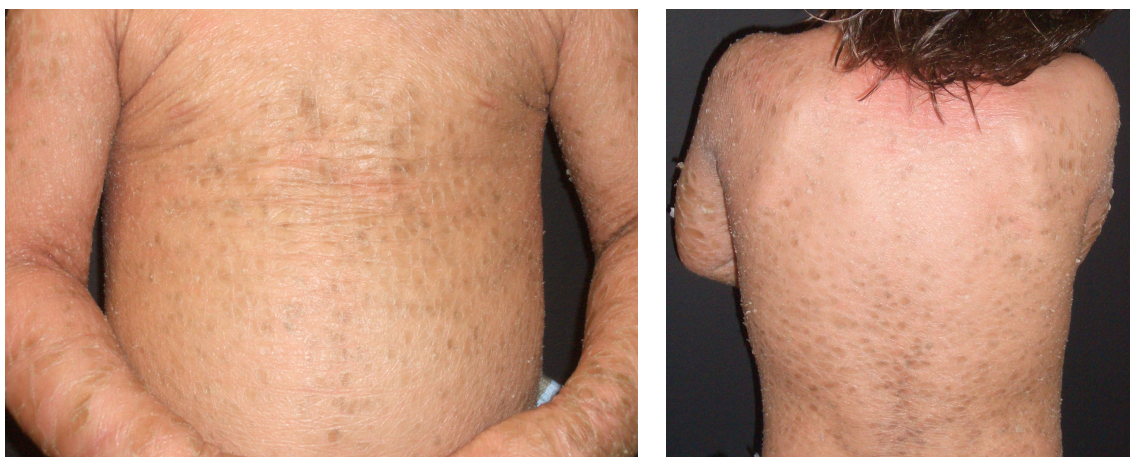


Figura 31. Paciente 1.II.1 a la edad de dos años mostrando escamas generalizadas, laminares y parduzcas características de IL.



Figura 32. Escamas laminares marrónceas afectando cara posterior de muslos y huecos poplíteos e hiperqueratosis plantar en paciente 2.III.1.



Figura 33. Alteraciones ungueales y alopecia cicatricial en la paciente 2.II.2.



Figura 34. Paciente 3.II.3. Alopecia cicatricial en la periferia del cuero cabelludo. Escamas grandes blanquecinas y eritema en extremidades (estando a tratamiento con retinoides orales).



Figura 35. Características clínicas del paciente 4.II.1. Se observa descamación generalizada marronácea de tipo laminar.



Figura 36. Xerosis marcada e hiperqueratosis en la paciente 6.II.1 (izquierda). Apenas presentó escamas debido a su eliminación mecánica durante el baño. Descamación blanquecina laminar generalizada, con afectación de fosas antecubitales, en paciente 8.II.2 (centro y derecha).



Figura 37. Cuadro severo de IL en los pacientes 11.II.4 y 11.II.6. Presentaron marcado ectropion, acumulación de escamas en conducto auditivo externo, alopecia cicatricial de cuero cabelludo y cejas y descamación laminar marronácea generalizada. Se observaron también contracturas de los dedos de las manos y los pies y alteraciones ungueales.



Figura 38. Descamación limitada a la parte alta de la espalda y leve eritema en paciente 10.II.1 (izquierda). Descamación fina y eritema en paciente 14.IV.3 (derecha). Ambas recibían tratamiento con retinoides orales.



Figura 39. Hiperlinealidad palmar, leve eritema y descamación fina y blanquecina generalizada en paciente 16.II.1.

Tabla 9. Resumen de los pacientes con ICAR y sus características clínicas.

Id <sup>1</sup>	Sexo <sup>2</sup>	Edad <sup>3</sup>	Membrana colodión <sup>4</sup>	Prematuridad <sup>4</sup>	Escamas laminares <sup>4</sup>	Escamas finas <sup>4</sup>	Color escamas <sup>5</sup>	Eritema <sup>4</sup>	Ectropion <sup>4</sup>	Alopecia <sup>4</sup>	Hiperqueratosis palmoplantari <sup>4</sup>	Tratamiento <sup>6</sup>	Diagnóstico clínico
1.II.17	V	2	+	DP	+	-	N	-	+	+	+	R	IL
2.III.17	M	25	-	-	+	-	N	-	-	-	+	R	IL
2.II.2	M	56	+	+	+	-	N	-	+	+	+	T	IL
3.II.37	M	27	+	+	+	-	B	-	+	+	+	R	IL
4.II.17	V	1	+	+	+	-	N	-	+	-	-	T	IL
5.II.17	M	31	+	+	+	-	N	+	+	+	+	R	IL
6.II.17	M	7	+	-	+	-	B	-	+	-	+	T	IL
7.II.27	V	46	+	+	+	-	N	+	+	+	+	R	IL
8.II.17	M	16	+	+	+	-	N	-	+	-	+	T	IL
8.II.2	M	9	+	+	+	-	B	-	+	-	+	T	IL
9.II.2	M	80	-	-	+	-	B	-	+	+	-	T	IL
9.II.17	M	84	DP	+	+	-	B	-	+	+	+	T	IL
10.II.17	M	11	+	+	+	-	B	-	+	+	+	R	IL
11.II.47	V	56	+	-	+	-	N	-	+	+	+	R	IL
11.II.6	V	52	+	-	+	-	N	-	+	+	+	R	IL
12.II.17 <sup>8</sup>	M	15	-	-	-	+	N	-	-	+	+	R	EIC
13.IV.57 <sup>8</sup>	M	36	+	-	-	+	B	+	-	-	+	T	EIC
14.IV.37 <sup>8</sup>	M	16	+	+	+	-	N	-	+	+	+	R	IL
15.II.17 <sup>8</sup>	M	43	-	+	-	+	B	-	+	+	+	R	IL
16.II.17 <sup>8</sup>	V	4	-	-	+	+	B	+	-	-	-	T	EIC

<sup>1</sup> El primer número se refiere a la familia y los dos siguientes al individuo afectado (ver árboles genealógicos).

<sup>2</sup> M: mujer; V: varón.

<sup>3</sup> Edad en el momento del estudio.

<sup>4</sup> Un signo positivo (+) indica la presencia de la condición; Un signo negativo (-) indica la ausencia de la condición; DP: dato perdido.

<sup>5</sup> N: negras, oscuras, marrónáceas; B: blanquecinas.

<sup>6</sup> T: tratamientos tópicos solos; R: retinoides orales.

<sup>7</sup> Probandos.

<sup>8</sup> Pacientes en los que se analizaron también los genes *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* y *CYP4F22*.

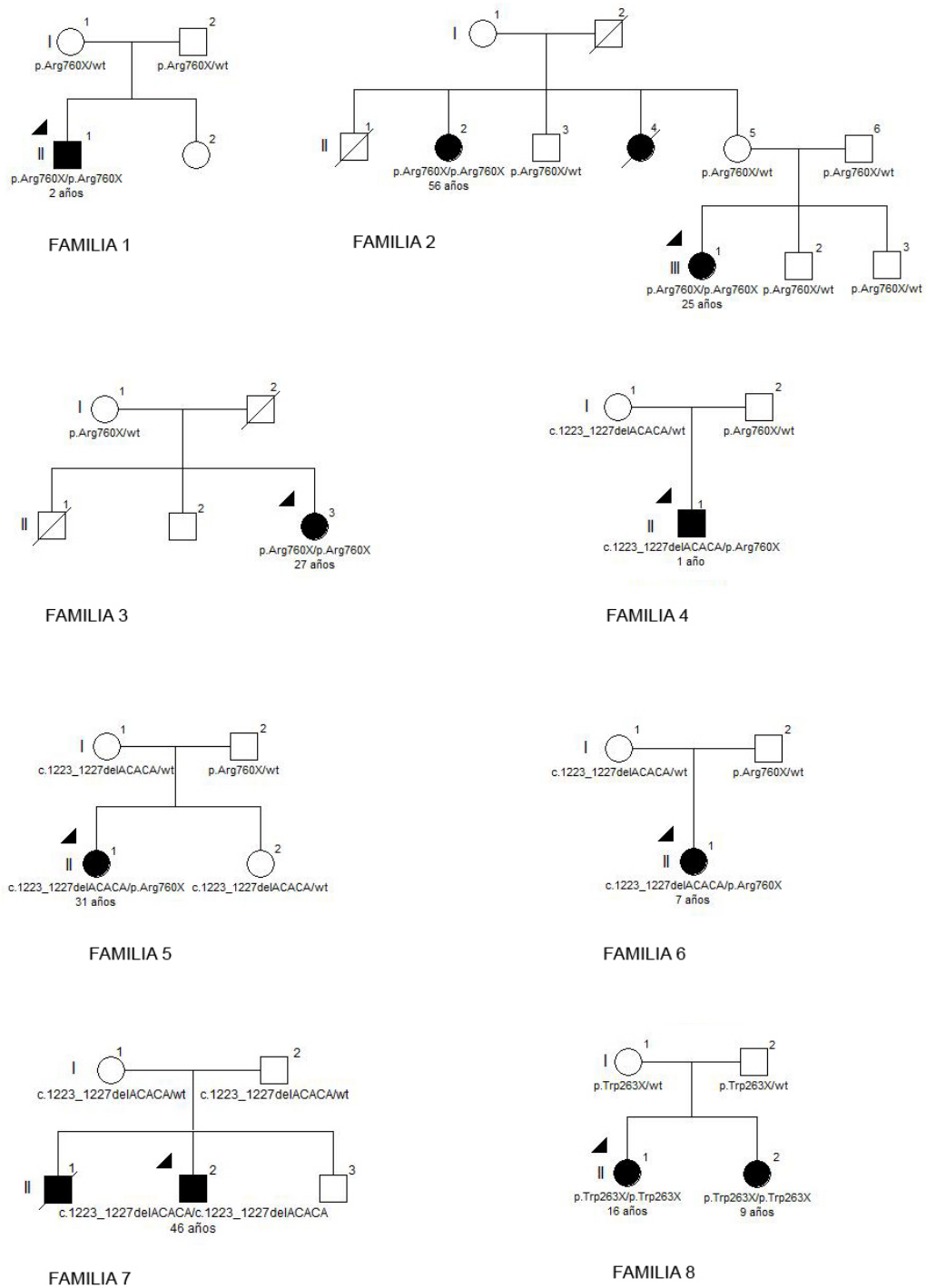


Figura 40. Árboles genealógicos de las familias gallegas con ICAR estudiadas (Familias de la 1 a la 8). Debajo de los símbolos se indican las mutaciones detectadas en los sujetos estudiados y la edad de los pacientes en el momento del estudio.

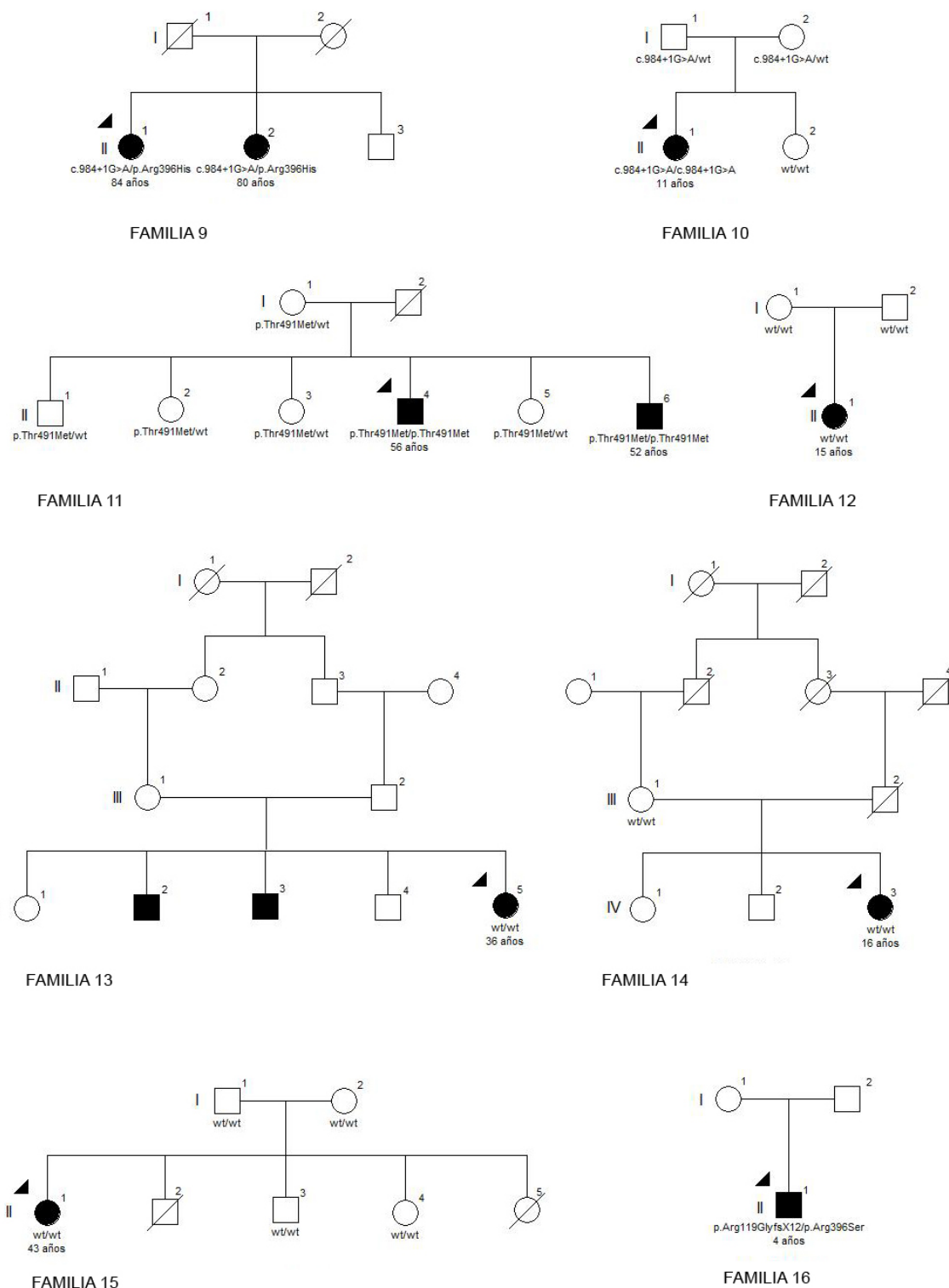


Figura 41. Árboles genealógicos de las familias gallegas con ICAR estudiadas (Familias de la 9 a la 16). Debajo de los símbolos se indican las mutaciones detectadas en los sujetos estudiados y la edad de los pacientes en el momento del estudio.

## 4.2. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Se estudiaron las características ultraestructurales de la piel afecta en diez pacientes pertenecientes a nueve familias (Tabla 10, Fig. 42).

La presencia de cristales de colesterol a nivel del estrato córneo permitió clasificar a dos de los pacientes (2.II.2 y 5.II.1) como ictiosis tipo 2. En los demás casos estudiados los hallazgos fueron compatibles con ictiosis tipo 1, al observarse un número variable de gotas lipídicas en el estrato córneo, sin identificarse otras estructuras como cristales de colesterol, estructuras membranosas elongadas o paquetes membranosos. En el paciente 16.II.1 no se observaron datos patológicos en la ultraestructura que nos permitieran clasificarlo. En el paciente 1.II.1, además de las gotas lipídicas, se observaron agregados electrodensos anormales en la periferia de los corneocitos. En el resto de las muestras no se pudo comprobar la existencia de este hallazgo.

Tabla 10. Clasificación ultraestructural de los pacientes.

Paciente	1.II.1	2.II.2	5.II.1	6.II.1	8.II.1	10.II.1	11.II.4	11.II.6	15.II.1	16.II.1
Tipo ultraestructural	1	2	2	1	1	1	1	1	1	NC

NC: no clasificable.

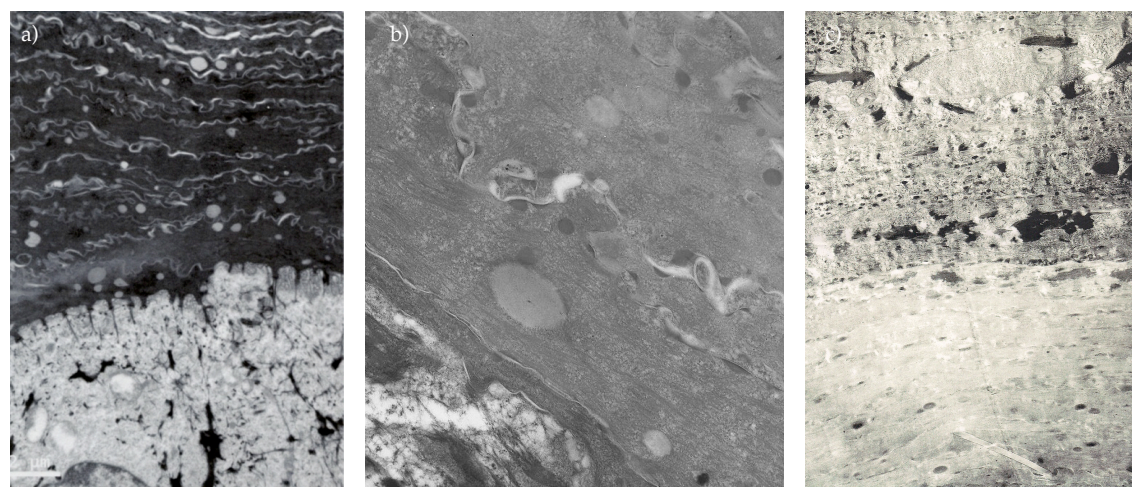


Figura 42. Hallazgos ultraestructurales. a) Gotas lipídicas en la capa córnea en la paciente 10.II.1. b) En la periferia de los corneocitos, además de gotas lipídicas, se observaron estructuras electrodensas (paciente 1.II.1). c) Cristales de colesterol en la capa córnea del paciente 2.II.2.

### 4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS Y BIOINFORMÁTICOS

Se identificaron mutaciones en doce de las dieciséis familias con ICAR (75%). Del total de estas familias, once presentaron probandos con IL y una presentó un probando con EIC. En once de las familias se identificaron mutaciones en el gen *TGM1* y en una en el gen *ALOXE3*. No se identificaron mutaciones en los genes *ALOX12B*, *NIPALA* y *CYP4F22*.

Todos los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* presentaron un fenotipo de IL. Siete probandos (63,64%) fueron portadores homocigotos y cuatro (36,36%) heterocigotos. No se identificaron mutaciones en el gen *TGM1* en las tres familias con EIC, ni en dos de las familias con IL. El análisis mediante secuenciación directa de las regiones codificantes y de las zonas de unión exón-intrón del gen *TGM1* mostró siete mutaciones germinales diferentes, incluyendo tres mutaciones *missense*, dos *nonsense*, una *frameshift* y una *splice-site*. Las mutaciones identificadas se distribuyeron en distintas regiones del gen, localizándose en el intrón 6 y en los exones 5, 8, 9, 10, 11 y 15. Seis de las mutaciones se situaron en el *catalytic core*, y la otra en el dominio  $\beta$ -barrel 2 (Fig. 43).

La mutación más frecuente detectada en nuestra población fue la c.2278C>T (p.Arg760X). Esta mutación *nonsense* es responsable del 40,91% de los alelos mutados en el gen *TGM1* en los probandos de Galicia. Siete pacientes de seis familias son portadores de la p.Arg760X, cuatro de ellos en homocigosis. Otra mutación recurrente en nuestra población es la delección c.1223\_1227delACACA (p.Asp408ValfsX21), detectada en cuatro familias. Para esta mutación, un probando es homocigoto y tres heterocigotos compuestos junto con la p.Arg760X, dando un total de cinco alelos mutados (22,73% de los alelos mutados del gen *TGM1*). Además, identificamos la mutación *splice-site* c.984+1G>A en dos familias no relacionadas, en una de ellas en homocigosis. Otras mutaciones en el gen *TGM1* encontradas en nuestros pacientes fueron: la mutación *nonsense* c.788G>A (p.Trp263X) y las sustituciones *missense* c.1559A>G (p.Glu520Gly), c.1187G>A (p.Arg396His) y c.1472C>T (p.Thr491Met), esta última descrita por primera vez en el presente trabajo (Tablas 11, 12 y Figs. 45-51).

Se identificaron mutaciones en el gen *ALOXE3* en un único paciente (6,25% de todos los probandos con ICAR) suponiendo el 33,33% de los casos de EIC. El paciente es portador heterocigoto de las mutaciones c.434G>A (p.Arg119GlyfsX12) y c.1186C>A (p.Arg396Ser). La

mutación *splice-site* p.Arg119GlyfsX12 se localiza en el exón 3 a nivel del dominio  $\beta$ -barrel y la mutación *missense* p.Arg396Ser se localiza en el exón 9 a nivel del *catalytic core* (Fig. 44 y 52-54). También se identificó la variante c.709T>A (p.Leu237Met), considerada no deletérea, en estado heterocigoto en un paciente con IL. Esta variante se sitúa en el exón 6 a nivel del *catalytic core*.

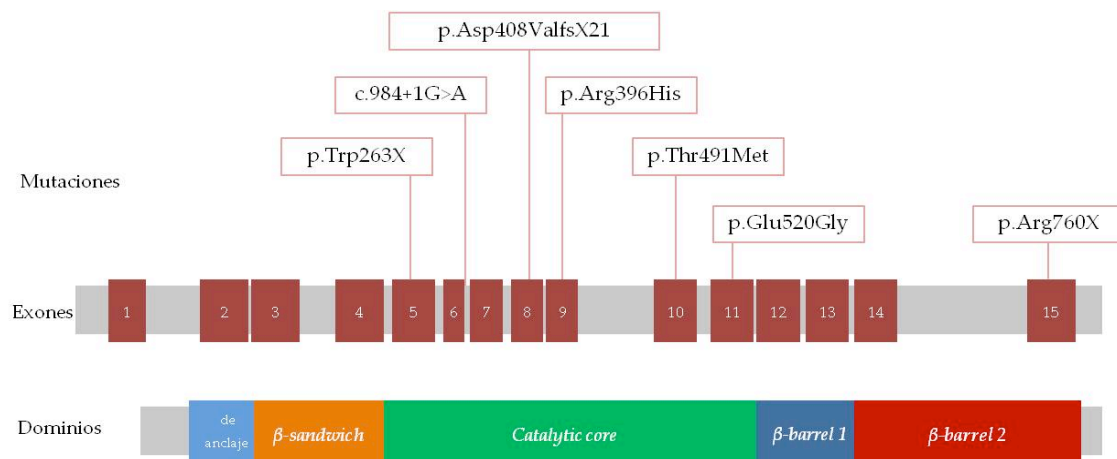


Figura 43. Mutaciones detectadas en el gen *TGM1*.

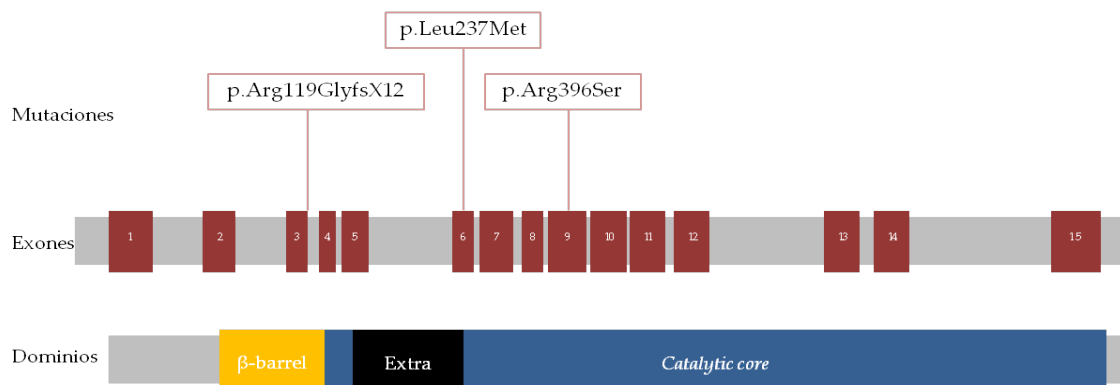


Figura 44. Mutaciones y variantes detectadas en el gen *ALOXE3*.

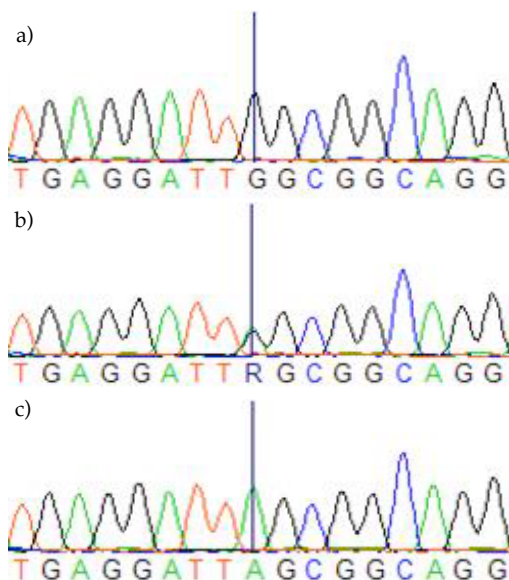
Electroferogramas de la secuenciación directa de las mutaciones detectadas en el gen *TGM1*:

Figura 45. Mutación c.788G>A (p.Trp263X). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis. c) Mutación en homocigosis.

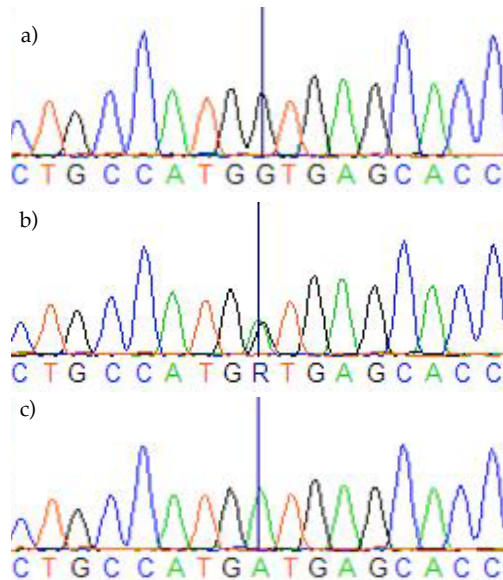


Figura 46. Mutación c.984+1G>A. a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis. c) Mutación en homocigosis.

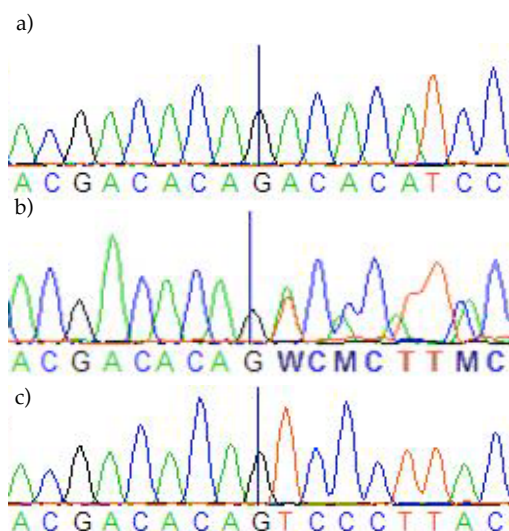


Figura 47. Mutación c.1223\_1227delACACA (p.Asp408ValfsX21). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis. c) Mutación en homocigosis.

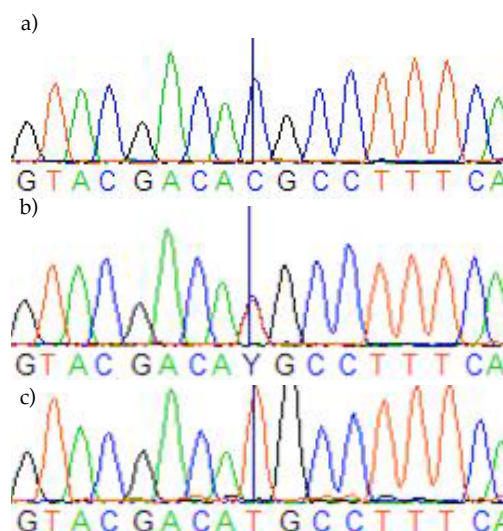


Figura 48. Mutación c.1472C>T (p.Thr491Met). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis. c) Mutación en homocigosis.

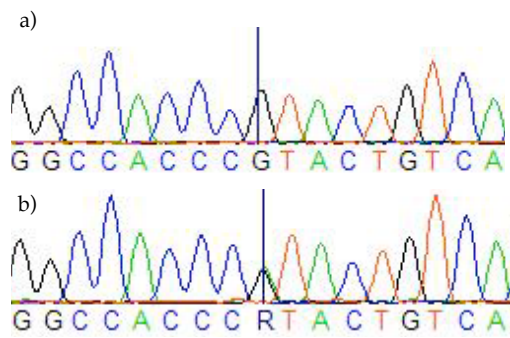


Figura 49. Mutación c.187G>A (p.Arg396His). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis.

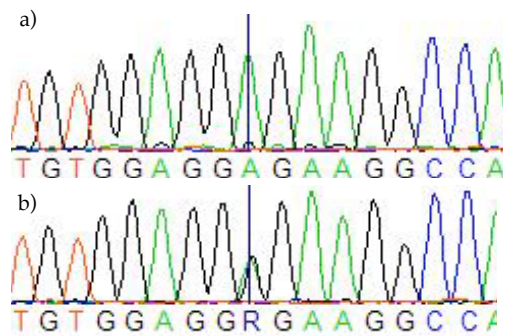


Figura 51. Mutación c.1559A>G (p.Glu520Gly). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis.

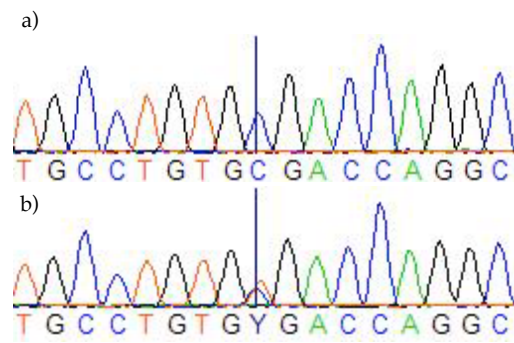


Figura 50. Mutación c.2278C>T (p.Arg760X). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis. c) Mutación en homocigosis.

**Electroferogramas de la secuenciación directa de las mutaciones y variantes detectadas en el gen *ALOXE3*:**

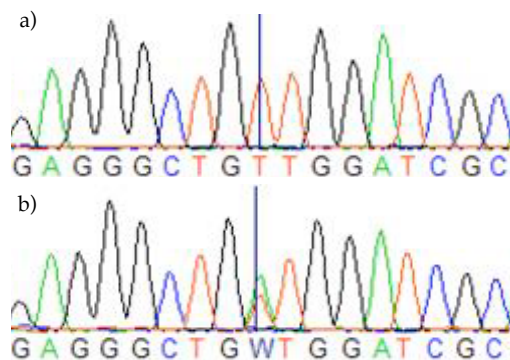


Figura 52. Variante c.709C>A (p.Leu237Met). a) Secuencia *wild-type*. b) Variante en heterocigosis.

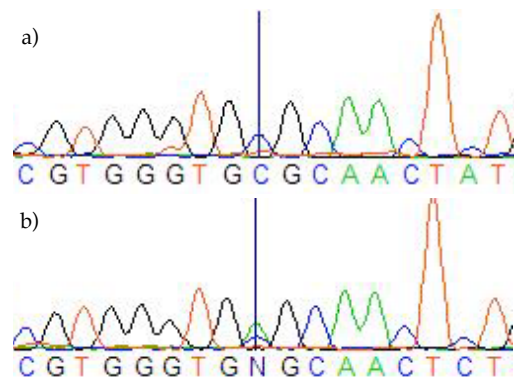


Figura 53. Mutación c.1186C>A (p.Arg396Ser). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis.

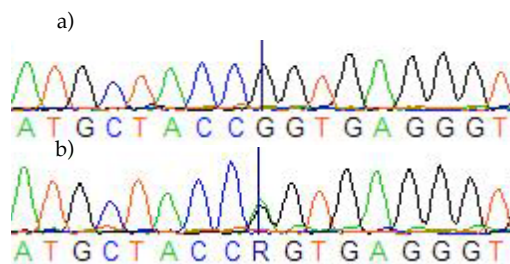


Figura 54. Mutación c.434C>A (p.Arg119GlyfsX12). a) Secuencia *wild-type*. b) Mutación en heterocigosis.

Tabla 11. Características de las mutaciones y variantes detectadas en este estudio.

Gen	Cambio nucleótido	Efecto de la mutación	Exón/ Dominio	Tipo de variación	Nº alelos mutados % (por gen)	Nº alelos controles %	Descrito previamente por
TGM1	c.788G>A	p. Trp263X	Exón 5 <i>Catalytic core</i>	Nonsense	2 9.09%	-	Hennies <i>et al</i> 1998
TGM1	c.984+1G>A	p.Val330MetfsX12/ p.Met329_Val330ins10	Intron 6 <i>Catalytic core</i>	Splice site	3 13.64%	-	Herman <i>et al</i> 2008
TGM1	c.1223_1227delACACA	p.Asp408ValfsX21	Exón 8 <i>Catalytic core</i>	Frameshift	5 22.73%	-	Herman <i>et al</i> 2008
TGM1	c.1187G>A	p.Arg396His	Exón 9 <i>Catalytic core</i>	Missense	1 4.54%	0	Farasat <i>et al</i> 2008
TGM1	c.1472C>T	p.Thr491Met	Exón 10 <i>Catalytic core</i>	Missense	2 9.09%	0	Este trabajo
TGM1	c.1559A>G	p.Glu520Gly	Exón 11 <i>Catalytic core</i>	Missense	-	2 1%	Esposito <i>et al</i> 2001
TGM1	c.2278C>T	p.Arg760X	Exón 15 $\beta$ -Barrel 2	Nonsense	9 40.91%	-	Shevchenko <i>et al</i> 2000
ALOXE3	c.434G>A	p.Arg119GlyfsX12	Exón 3 $\beta$ -Barrel	Splice site	1 50.00%	-	Eckl <i>et al</i> 2009
ALOXE3	c.709T>A <sup>1</sup>	p.Leu237Met	Exón 6 <i>Catalytic core</i>	Missense	-	0	Eckl <i>et al</i> 2005
ALOXE3	c.1186C>A	p.Arg396Ser	Exón 9 <i>Catalytic core</i>	Missense	1 50.00%	0	Jobard <i>et al</i> 2002

<sup>1</sup> Definida como no deletérea por Eckl *et al.*, 2009.

Tabla 12. Mutaciones y variantes detectadas en los pacientes con ICAR.

Id	Variantes identificadas
1.II.1	p.Arg760X+p.Arg760X
2.III.4	p.Arg760X+p.Arg760X
2.II.2	p.Arg760X+p.Arg760X
3.II.3	p.Arg760X+p.Arg760X
4.II.1	c.[1223_1227delACACA]+p.Arg760X
5.II.1	c.[1223_1227delACACA]+p.Arg760X
6.II.1	c.[1223_1227delACACA]+p.Arg760X
7.II.2	c.[1223_1227delACACA]+[1223_1227delACACA]
8.II.1	p.Trp263X+p.Trp263X
8.II.2	p.Trp263X+p.Trp263X
9.II.2	c.[984+1G>A];p.Glu520Gly+p.Arg396His
9.II.1	c.[984+1G>A];p.Glu520Gly+p.Arg396His
10.II.1	c.[984+1G>A];p.Glu520Gly+c[984+1G>A];p.Glu520Gly
11A	p.Thr491Met+p.Thr491Met
11B	p.Thr491Met+p.Thr491Met
12.II.1	-
13.IV.5	-
14.IV.3	-
15.II.1	p.Leu237Met+[=]
16.II.1	p.Arg119GlyfsX12+p.Arg396Ser

Dentro de las mutaciones identificadas se han encontrado cambios *missense* y alteraciones que pueden afectar al proceso de *splicing*. Para conocer la patogenicidad de estas alteraciones se siguieron diferentes estrategias que se detallan a continuación:

---

#### 4.3.1. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES *MISSENSE*

En los pacientes estudiados se detectaron cinco sustituciones *missense*: p.Arg396His, p.Thr491Met y p.Glu520Gly en el gen *TGM1* y p.Leu237Met y p.Arg396Ser en el gen *ALOXE3*. Las mutaciones p.Arg396His y p.Glu520Gly se identificaron en heterocigosis en dos pacientes pertenecientes a una misma familia que portaban también la mutación *splice-site* c.984+1G>A. La mutación p.Thr491Met se identificó en homocigosis en dos pacientes de la misma familia y la p.Arg396Ser se detectó en heterocigosis junto con la mutación *splice-site* p.Arg119GlyfsX12 en un único paciente. La variante p.Leu237Met se identificó en heterocigosis en un paciente en el que no se encontró ninguna mutación en el otro alelo.

##### 4.3.1.1. ESTUDIO DE POBLACIÓN CONTROL

Todas las mutaciones *missense* fueron estudiadas en 200 cromosomas de individuos controles de nuestra población. Se detectó la mutación p.Glu520Gly en dos alelos (2%), mientras que las demás mutaciones no se identificaron en ningún individuo de la población.

##### 4.3.1.2. ESTUDIOS *IN SILICO*

Para estudiar el impacto de las mutaciones *missense* en la función de la proteína, se utilizó el *software* Alamut v1.4. Este programa combina diferentes herramientas bioinformáticas, como Align GVGD, Polyphen y SIFT, para predecir los efectos del cambio aminoacídico. Para medir el grado de conservación entre especies, se utilizaron para el gen *TGM1* las secuencias de quince especies (desde el *Homo sapiens* hasta la mosca de la fruta) y para el gen *ALOXE3* de diecisiete especies (desde el *Homo sapiens* hasta el alga *Ciona savignyi*). Las predicciones de las herramientas bioinformáticas se recogen en las siguientes tablas.

## Resultados

Tabla 13. Scores y predicciones de Align GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>).

Mutación	Variación de Grantham	Desviación de Grantham	Clase	Predicción
p.Arg396His	0,00	28,82	C25	Más probable que interfiera con la función
p.Thr491Met	79,04	59,13	C0	Menos probable que interfiera con la función
p.Glu520Gly	246,10	0,00	C0	Menos probable que interfiera con la función
p.Leu237Met	171,76	0,00	C0	Menos probable que interfiera con la función
p.Arg396Ser	26,00	104,92	C35	Más probable que interfiera con la función

Tabla 14. Scores y predicciones de SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>).

Mutación	Conservación de la secuencia	Secuencias en esa posición	SIFT score	Predicción
p.Arg396His	3,37	14	0,00	Dañina
p.Thr491Met	3,37	14	0,05	Dañina
p.Glu520Gly	3,37	13	0,07	Tolerada
p.Leu237Met	2,94	17	0,09	Tolerada
p.Arg396Ser	2,94	17	0,01	Dañina

Tabla 15. Scores y predicciones de POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>).

Mutación	Score	Sensibilidad	Especificidad	Predicción
p.Arg396His	0,973	0,55	0,91	Probablemente dañina
p.Thr491Met	0,898	0,68	0,85	Probablemente dañina
p.Glu520Gly	0,886	0,69	0,85	Probablemente dañina
p.Leu237Met	0,609	0,80	0,86	Posiblemente dañina
p.Arg396Ser	0,994	0,35	0,96	Probablemente dañina

#### 4.3.1.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR

La conformación secundaria y terciaria de las proteínas TGM1 y ALOXE3 no se conocen (no ha sido cristalizada). Por ello, el factor de coagulación humano XIIIa (Fig. 55a), una TGasa de estructura conocida (molde 1ex0.pdb), y la 15-LOX de conejo (Fig. 55f) (molde 2P0M.pdb) se han usado para modelar la TGM1 y la ALOXE3, respectivamente.

Las tres mutaciones *missense* del gen *TGM1* están localizadas en el *catalytic core* (Fig. 55a) próximas a los residuos catalíticos. Los efectos de cada una de ellas sobre el plegamiento de la proteína se detallan a continuación:

- **p.Arg396His.** Al analizar los efectos de esta mutación, se observó que el residuo Arg396 está situado en la superficie de una lámina, entre una hélice y otra lámina. Este aminoácido establece dos puentes de hidrógeno con el residuo Lys444 que contribuyen a estabilizar el patrón de plegamiento de la proteína (Fig. 55b). Cuando la Arg396 muta a histidina, se crean tres nuevos puentes de hidrógeno con los residuos Asp440 y Thr529 (Fig. 55c). La modelización molecular predice que la nueva His396 provocaría un plegamiento anormal de la proteína al acercar la lámina donde está localizado el residuo Thr529 a la His396.
- **p.Thr491Met.** La mutación p.Thr491Met también altera el plegamiento de la proteína. La Thr491 es un aminoácido hidrofílico altamente conservado que se localiza en la superficie externa de la última hélice del *catalytic core*. Este residuo forma un puente de hidrógeno con la Ser476 (Fig. 55d) y contribuye a estabilizar el plegamiento entre dos hélices consecutivas. Cuando este residuo cambia a metionina, el nuevo aminoácido hidrofóbico intenta plegarse hacia un ambiente más hidrofóbico y genera un nuevo puente de hidrógeno con la Phe495 (Fig. 55e).
- **p.Glu520Gly.** A diferencia de las dos mutaciones anteriores, la p.Glu520Gly no altera la conformación de la proteína. Ni el aminoácido Glu520 ni el residuo mutado Gly520 contribuyen a estabilizar la lámina en la que están localizados ya que no parece que formen puentes de hidrógeno con residuos adyacentes.

La variante *missense* p.Leu237Met y la mutación *missense* p.Arg396Ser en el gen *ALOXE3* (Fig. 55f) se localizan a nivel del dominio *catalytic core* de la proteína, próximas al residuo catalítico ligador de hierro.

- **p.Leu237Met.** La modelización molecular corroboró que la variante p.Leu237Met no altera la conformación de la proteína. El residuo Leu237 está localizado entre una hélice y una lámina

en el dominio específico extra, sin formar puentes de hidrógeno con los residuos adyacentes. El reemplazamiento de la leucina por metionina no altera el patrón de plegamiento.

- **p.Arg396Ser.** La mutación p.Arg396Ser tiene consecuencias a nivel proteico. El residuo Arg396 está localizado entre dos hélices. Forma un puente de hidrógeno con el residuo Phe400 que contribuye a estabilizar el giro con la siguiente hélice (Fig. 55g). Cuando Arg396 muta a serina, este puente de hidrógeno permanece (Fig. 55h). Sin embargo, el cambio de polaridad hace que el nuevo residuo, Ser396, se pliegue hacia el interior de la proteína.

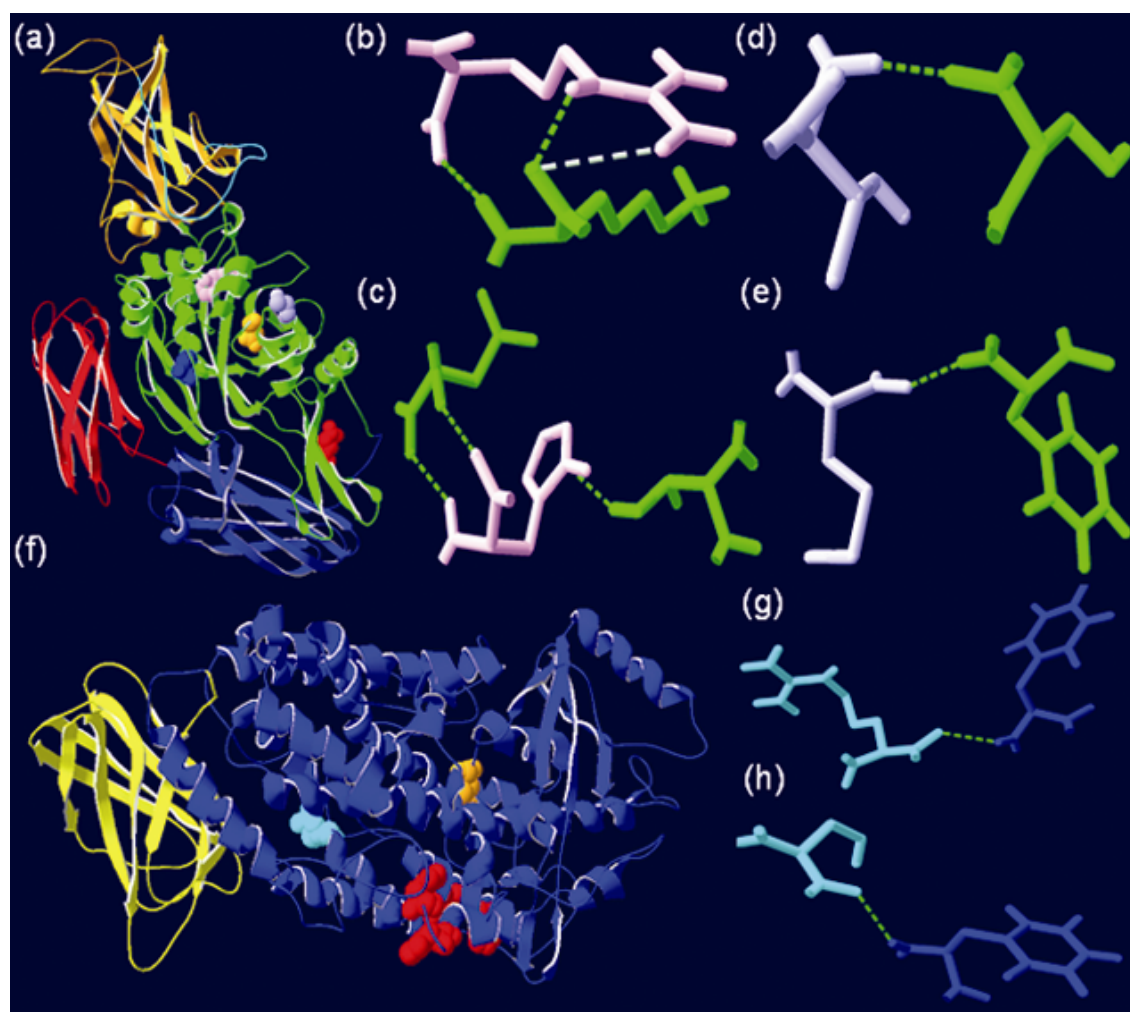


Figura 55. Modelización molecular de las proteínas TGM1 y ALOXE3. a) TGM1 coloreada por dominios: dominio de anclaje (azul claro), *b-sandwich* (naranja), *catalytic core* (verde),  $\beta$ -barrel 1 (azul oscuro) y  $\beta$ -barrel 2 (rojo). Los residuos catalíticos Cys377 (azul oscuro), His436 (azul claro) y Asp459 (naranja) y los residuos Arg396 (rosa), Thr491 (violeta) y Glu520 (rojo) aparecen dibujados sobre el diagrama. b) Puentes de hidrógeno del residuo Arg396 (rosa). Se establecen dos puentes de hidrógeno (para uno de los grupos se dibujan los dos puentes posibles). c) Puentes de hidrógeno de la His396 (rosa). d) Puentes de hidrógeno para Thr491 (violeta). e) Puentes de hidrógeno para Met491 (violeta). f) ALOXE3 coloreada por dominios:  $\beta$ -barrel (amarillo) y *catalytic core* (azul oscuro). Los residuos catalíticos ligadores de hierro His408, His588 y Asn592 (rojos) y los residuos Leu237 (naranja) y Arg396 (azul claro) aparecen dibujados sobre el diagrama. g) Puentes de hidrógeno para Arg396 (azul claro). h) Puentes de hidrógeno para Ser396 (azul claro).

### 4.3.2. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN C.984+1G>A EN EL TGM1

La mutación c.984+1G>A fue identificada en tres pacientes de dos familias. Esta mutación supone un cambio en el primer nucleótido del intrón 6 que se corresponde con un sitio dador de *splicing*, lo que sugiere que esta alteración pueda tener efectos en el *splicing*. Para conocer si este cambio nucleotídico afectaba al proceso de *splicing* se realizaron estudios de ARN y estudios bioinformáticos.

#### 4.3.2.1. ESTUDIOS *IN SILICO*

Para conocer el efecto que la mutación c.984+1G>A podría tener en el proceso de *splicing*, se utilizó la herramienta HSF v2.4.1. Como puede observarse en la figura extraída de ese *software* (Fig. 56), la mutación conllevaría la pérdida del sitio dador de *splicing* según la matriz HSF y produciría una variación de -98,91% en la secuencia del mismo según la matriz MaxEnt (Fig. 57).

**Human Splicing Finder**  
**Analyze mutation(s): Results**

Characters representing exonic nucleotides are in upper-case and characters representing intronic characters in lower-case. The mutation is emphasized in red, and the wild-type nucleotide whose position is those of the mutation in green.

In the tables below, positions in sequence for the 5' intron are labeled as negative and as positive for the 3' intron.

Variations in the tables below are noted in colored boxes, according to the following scale:

Site broken	0% - 25% variation	26% - 50% variation	51% - 75% variation	76% - 100% variation	New site
-------------	--------------------	---------------------	---------------------	----------------------	----------

In referring to work done using Human Splicing Finder, please cite: *FO Desmet, Hamroun D, Lalonde M, Coliod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acid Research, 2009, April*

---

**TGM1 c.984+1G>A**

**Reference sequence** TGM1 Gene > ENST00000206765 Transcript > Exon number: 6 (108 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

```

1 caccacagagg agctgggggtg ggtgtggggg ctgggggtatt ggagcagggt gctggcctag ggttcaggct gtcacctctg cctccatcc
ctccttcag
101 TTTGACCACG GGTGCTGGA TGCCTGCTTA TACATCCTGG ACCGGCGGGG GATGCCATAT GGAGGCCCTG GAGACCCAGT CAATGTCTCC
CGGTCATCT
201 CTGCCATGgt gagcaccctc acatctctga gtccactgt gtgtgtgct gctgcctcgc cacaccccca cctcctcct gccctttctg
gattcctcaa
301 gaaccccc
Total sequence length: 308 nucleotides

```

**Mutant sequence**

```

1 caccacagagg agctgggggtg ggtgtggggg ctgggggtatt ggagcagggt gctggcctag ggttcaggct gtcacctctg cctccatcc
ctccttcag
101 TTTGACCACG GGTGCTGGA TGCCTGCTTA TACATCCTGG ACCGGCGGGG GATGCCATAT GGAGGCCCTG GAGACCCAGT CAATGTCTCC
CGGTCATCT
201 CTGCCATGat gagcaccctc acatctctga gtccactgt gtgtgtgct gctgcctcgc cacaccccca cctcctcct gccctttctg
gattcctcaa
301 gaaccccc
Total sequence length: 308 nucleotides

```

Figura 56. Imagen generada por el *software* HSF v2.4.1 donde se indica la secuencia de referencia (arriba), la secuencia mutada (abajo) y la región a analizar (sombreado), utilizando la opción de análisis de mutación.

Potential splice sites [↑](#)

**HSF Matrices**

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
202	c.979	Acceptor	TGCCATGgtgagca	tgccatgatgagCA	68.43	68.5	NA	+0.1
206	c.983	Donor	ATGgtgagc	ATGatgagc	90.96	64.13	0	WT site broken -29.5

**MaxEnt**

Threshold values:  
5' Motif: 0 3' Motif: 0

Sequence Position	cDNA Position	5' Motif				3' Motif					
		Ref Motif	Ref Score	Mut Motif	Mut Score	Variation (%)	Ref Motif	Ref Score	Mut Motif	Mut Score	Variation (%)
206	c.983	ATGgtgagc	8.27	ATGatgagc	0.09	-98.91					

Figura 57. Resultados del análisis de mutación de las matrices HSF y MaxEnt para la mutación c.984+1G>A.

También se analizó, utilizando la misma herramienta, un fragmento que incluyó la mutación c.984+1G>A y que englobó el exón 6 (108pb) y 100pb a cada lado de él. La predicción de los sitios dadores y aceptores de *splicing*, según las matrices HSF y MaxEnt, se muestran en las figuras 58-60.

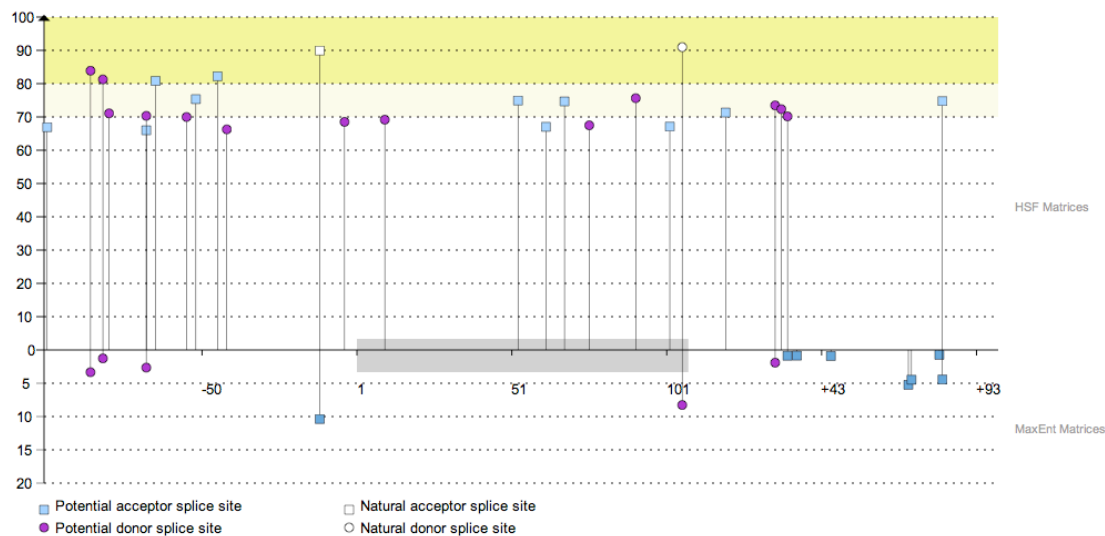


Figura 58. En la imagen se muestran los sitios dadores y aceptores de *splicing* en el fragmento analizado en torno al exón 6 (sombreado) según las matrices HSF (arriba) y MaxEnt (abajo). Los sitios dadores y aceptores de *splicing* constitutivos se representan con un círculo o cuadrado blanco, respectivamente. Los sitios dadores de *splicing* crípticos se dibujan como círculos violetas y los sitios aceptores de *splicing* crípticos se dibujan como cuadrados azules.

**HSF Matrices**  
Potential Donor and acceptor splice sites calculation is performed using a new algorithm.

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New potential splice site	Consensus value (0-100)
1	c.878-100	Acceptor	caccacagaggagct	caccacagaggagCT	68.24
15	c.878-86	Donor	gggggtgggt	GGGgtgggt	83.88
19	c.878-82	Donor	tgggtgtgg	TGGgtgtgg	81.27
21	c.878-80	Donor	gggtgtgggg	GGTgtgggg	71.08
33	c.878-68	Acceptor	ggggatattggagca	ggggatattggagCA	67.31
33	c.878-68	Donor	ggggatttg	GGGgtattg	70.33
36	c.878-65	Acceptor	gtattggagcaggg	gtattggagcagGG	82.15
46	c.878-55	Donor	aggggtctg	AGGgtctg	69.98
49	c.878-52	Acceptor	gtgctggcctaggg	gtgctggcctagGG	76.68
56	c.878-45	Acceptor	cctagggttcaggg	cctagggttcagGC	83.53
59	c.878-42	Donor	aggggtcag	AGGgtcag	66.26
89	c.878-12	Acceptor (WT)	ccctcctccagTT	ccctcctccagTT	91.24
97	c.878-4	Donor	ccagTTTGa	CCAgtttga	68.51
110	c.887	Donor	GGGTGCTG	GGGgtctg	69.17
153	c.930	Acceptor	TGCCATATGGAGGC	tgccatattggagGC	76.24
162	c.939	Acceptor	GAGCCGTGGAGAC	gaggccgtggagAC	68.37
168	c.945	Acceptor	GTGGAGACCCAGTC	gtggagaccagTC	75.98
176	c.953	Donor	CCAGTCAAT	CCAgtcfaat	67.48
191	c.968	Donor	CGGTCATC	CGGgtcatc	75.63
202	c.979	Acceptor	TGCCATGgtgagca	tgccatggtgagCA	68.43
206	c.983	Donor (WT)	ATGgtgagc	ATGgtgagc	90.96
220	c.985+12	Acceptor	cacatctctgagtc	cacatctctgagTC	72.65
236	c.985+28	Donor	actgtgtgt	ACTgtgtgt	73.46
238	c.985+30	Donor	tgtgtgtgt	TGTgtgtgt	72.33
240	c.985+32	Donor	tgtgtgtgc	TGTgtgtgc	70.16
290	c.985+82	Acceptor	ggattcctcaagaa	ggattcctcaagAA	76.08

Figura 59. Resultados del análisis de secuencia de la matriz HSF mostrando los sitios dadores y aceptores de *splicing* en el segmento analizado.

**MaxEnt**  
Yeo G and Burge CB. Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *Journal of Computational Biology*, March 1, 2004, 11

Threshold values:  
5' Motif: 0 3' Motif: 0

Sequence Position	cDNA Position	3' Motif	3' Score	5' Motif	5' Score
15	c.878-86			gggggtgggt	3.34
19	c.878-82			tgggtgtgg	1.27
33	c.878-68			ggggatattg	2.65
81	c.878-20	ccctcctccctcctccagTTT	9.71		
206	c.983			ATGgtgagc	8.27
232	c.985+24	tcctactgtgtgtgtgctgctg	0.21		
235	c.985+27	tactgtgtgtgtgctgctgct	0.19		
236	c.985+28			actgtgtgt	1.91
246	c.985+38	tgctgtgctgctgcccaccccc	0.24		
271	c.985+63	ccctcctcctgcccctttctggat	4.57		
272	c.985+64	ccctcctcctgcccctttctggat	3.8		
281	c.985+73	gcccttctggattcctcaagaa	0.07		
282	c.985+74	cccttctggattcctcaagaac	3.77		

Figura 60. Resultados del análisis de secuencia de la matriz MaxEnt mostrando los sitios dadores y aceptores de *splicing* en el segmento analizado.

#### 4.3.2.2. ANÁLISIS DE ARN

Se analizó el ARNm de linfocitos de sangre periférica mediante RT-PCR. Se utilizaron muestras de la paciente 10.II.1, portadora en homocigosis de la mutación c.984+1G>A, de sus padres (10.I.1 y 10.I.2), portadores heterocigotos, y de diez individuos no afectados de la población general. Se realizó una PCR utilizando dos *primers* situados entre los exones 5/6 y en el exón 8 y se detectó, tanto en casos como en controles, una isoforma natural sin el exón 7 ( $\Delta$ exón 7) (Fig. 61), que fue reportada en la base de datos GenBank (BankIt1434830Seq1 JF19518).

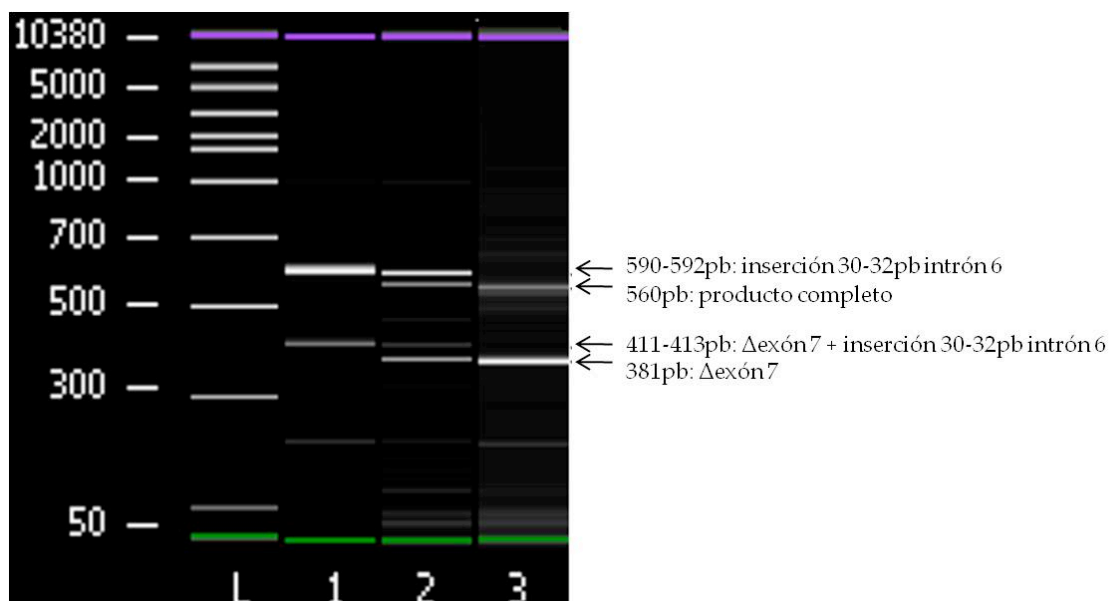


Figura 61. Electroforesis capilar de los productos de RT-PCR. La mutación c.984+1G>A provoca dos transcritos diferentes. La calle 1 se corresponde con un paciente homocigoto, la 2 con un portador heterocigoto y la 3 con un individuo control.

Posteriormente, para evitar los transcritos  $\Delta$ exón 7, se utilizó un *primer* interno en el exón 7. Este estudio identificó que la mutación c.984+1G>A se asociaba a dos productos aberrantes (Fig. 62). En los controles normales se evidenció un fragmento de 256 nucleótidos. Sin embargo, en portadores homocigotos y heterocigotos de la mutación se identificaron dos transcritos más largos, que incluían 30 o 32 nucleótidos del extremo 5' del intrón 6 (Fig. 62).

A nivel proteico, el transcrito que retiene 30pb del intrón 6 llevaría a la inserción *in frame* de diez aminoácidos (p.Met329\_Val330ins10). Sin embargo, el transcrito con la inserción de 32 nucleótidos codificaría una proteína truncada (p.Val330MetfsX12).

Los dos sitios dadores de *splicing* crípticos identificados mediante el análisis de ARN, situados 30 y 32pb del sitio constitutivo, habían sido predichos por el *software* HSF.



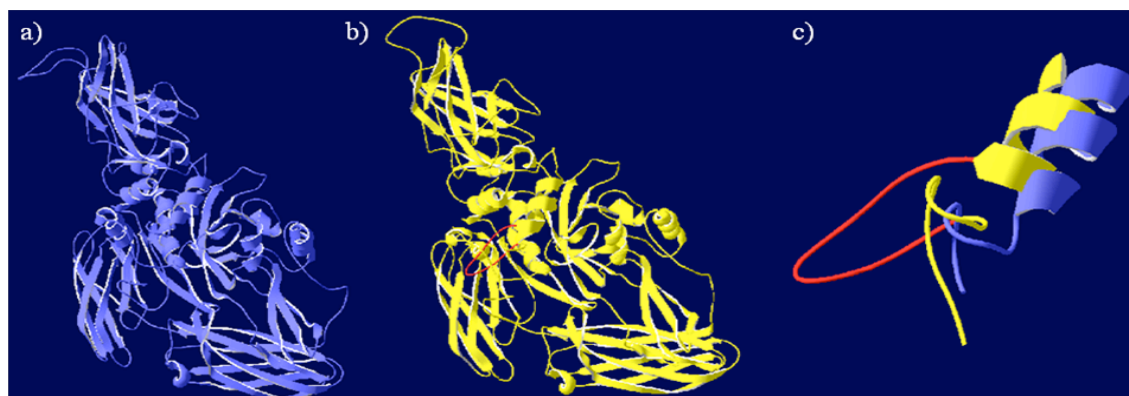


Figura 63. Modelización molecular de la proteína TGM1. a) TGM1 *wild-type* (azul); b) TGM1 (amarillo) con la inserción p.Met329\_330ins10 (rojo) y c) Detalle del lugar de inserción de p.Met329\_330ins10.

#### 4.3.3. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DATACIÓN DE MUTACIONES FUNDADORAS

En la población gallega se estimó alta prevalencia de ICAR y alta frecuencia de pacientes homocigotos para las mutaciones en el gen *TGM1* (63,64%). Tres de las mutaciones, la p.Arg760X, la c.1223\_1227delACACA y la c.984+1G>A, fueron observadas con alta frecuencia representando el 40,91%, 22,73% y 13,64% de todos los alelos mutados en el gen *TGM1* respectivamente. Además, estas tres mutaciones solo habían sido descritas en una única ocasión fuera de Galicia. Estos datos sugerían la existencia de episodios históricos de deriva génica en la población gallega.

Se puede distinguir una mutación fundadora de un *hotspot* determinando si la mutación apareció en un trasfondo genético común u ocurrió de forma independiente múltiples veces.

Para determinar si las tres mutaciones más frecuentes detectadas en Galicia fueron heredadas de un antepasado común se llevó a cabo un análisis de haplotipos usando 21 SNPs situados dentro y en torno al gen *TGM1* y diez microsatélites que se extendían a lo largo de una región de 12Mb alrededor del mismo gen. Tres de los SNPs genotipados (rs2855009, rs2229464 y rs7147300) fueron excluidos del estudio por ser monomórficos en la población gallega. Las variantes c.1559A>G y c.2160C>T, encontradas en el estudio de secuenciación, fueron incluidas ya que tenían una frecuencia superior al 1% en la población gallega control. Todos los marcadores empleados se recogen en la figura 64.

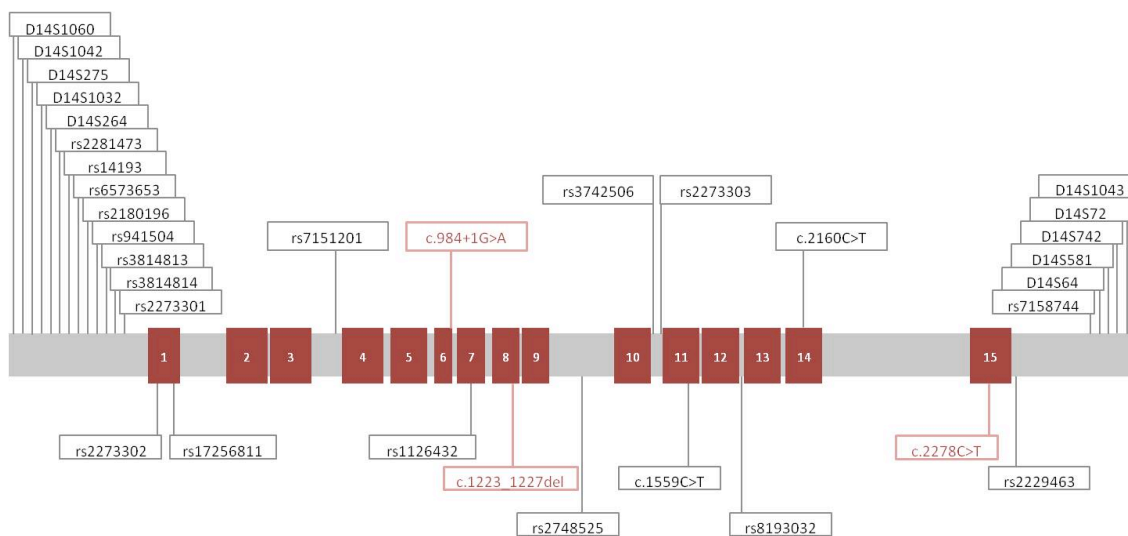


Figura 64. SNPs y microsatélites (recuadros grises) analizados en el estudio de haplotipos de los portadores de las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227delACACA y c.984+1G>A (recuadros rojos).

Una vez confirmada la existencia de mutaciones fundadoras, se utilizó el método bayesiano implementado con el *software* DMLE para calcular el origen de la mutación y dos métodos basados en el desequilibrio de ligamiento, el estimador de Bergman y el estimador de Risch corregido por Labuda, para calcular el número de generaciones desde el ACMR. Los parámetros utilizados para llevar a cabo estos cálculos fueron los siguientes:

- Se utilizaron los microsatélites que se encontraban fuera de la zona de haplotipo conservado. Puesto que los métodos basados en el desequilibrio de ligamiento solo permiten utilizar un marcador de cada vez, el número de generaciones fue calculado de forma separada para cada marcador y los resultados fueron ponderados sobre todos ellos.

- Como alelo fundador, de acuerdo con Bergman *et al.*<sup>305</sup>, se escogió el alelo más frecuente de cada microsatélite entre los cromosomas portadores de cada mutación.

- La frecuencia del alelo fundador en los cromosomas afectados se calculó dividiendo el número de cromosomas con la mutación que portaban ese alelo entre el total de cromosomas con la mutación. La frecuencia del alelo fundador en los cromosomas controles se estimó dividiendo el número de cromosomas sin la mutación que portaban ese alelo entre el total de cromosomas sin la mutación. En todos los casos se utilizaron como controles 200 cromosomas de la población general.

- Las distancias físicas de los distintos marcadores y mutaciones fueron convertidas a centimorgans (cM) asumiendo que la razón ponderada de recombinación por sexo es de  $1,36cM=1Mb^{311}$ . Para calcular las fracciones de recombinación a partir de las distancias del mapa se usó la función del mapa de Kosambi<sup>312</sup>.

- Se calculó una tasa de crecimiento poblacional de 0,107. Para ello se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: a) La población de Galicia en el momento actual está bien documentada por el Instituto Nacional de Estadística y es de 2.796.089; b) El censo de 1.591 estima la población de las seis provincias que constituían la región de Galicia en esa época en 629.336 y ofrece una imagen global de la población gallega en ese periodo<sup>313</sup>; c) Se asumen 30 años por generación<sup>314</sup>.

- La proporción de cromosomas portadores de cada mutación muestreada se ha calculado en función de las siguientes consideraciones: a) Se genotiparon todos los casos de ICAR en la población de Galicia; b) En caso de selección esta operaría en contra de los enfermos (portadores bialélicos), no considerándose ventaja o desventaja heterocigota, y siendo relativamente baja debido a la baja frecuencia de la enfermedad. Teniendo en cuenta que se encontraron cuatro pacientes homocigotos para la mutación p.Arg760X y un paciente homocigoto para c.1223\_1227delACACA, usando la ecuación de Hardy-Weinberg, se estimó que la frecuencia de los alelos de estas mutaciones en nuestra población es de 0,1196% y 0,0598% respectivamente. Así, la proporción de cromosomas portadores de las mutaciones muestreada se estimó en 0,000033 y 0,000030 respectivamente.

#### 4.3.3.1. MUTACIÓN c.2278C>T (p.Arg760X)

Seis familias fueron portadoras de esta mutación, tres de ellas en estado homocigoto (Familias 1, 2 y 3, ver árboles genealógicos). Se incluyó en el estudio de haplotipos una nueva familia (Familia 17) en la que, aunque el paciente afecto había fallecido, su haplotipo podía ser inferido a partir del de los padres. Además, en la Familia 2, el probando y su tía materna tenían IL. Por eso, en esta familia se consideraron tres alelos diferentes: dos del probando y uno de la tía materna (el alelo de la rama materna no transmitido al probando por su madre). El estudio se realizó, además de en los probandos, en los familiares disponibles y en 100 individuos de la población general. En todas las familias, excepto en la 3, se estudiaron el probando y sus padres. Si se disponía de otros familiares (hermanos, tíos...), éstos también fueron estudiados. En la familia 3 solo se pudo analizar el probando y su madre.

En la región analizada, en los cromosomas portadores de la mutación p.Arg760X, se encontró un haplotipo común de 2,6cM que incluía todos los marcadores intragénicos del gen *TGM1* y catorce marcadores localizados cerca de él (del D14S1032 al D14S581) (Tabla 18). En los 200 cromosomas de la población general se identificaron muchos haplotipos diferentes. Sin embargo, ninguno de ellos era igual al de los pacientes. Dos de los alelos (2.III.1.A y 17.II.1.A) compartían un haplotipo común de 15,25cM (de D14S1060 a D14S742), indicando una relación más cercana entre estas familias (Familias 2 y 17) aunque no referían consanguinidad ni antepasados comunes en las últimas cuatro generaciones.

Una vez confirmada la existencia de un efecto fundador para la mutación p.Arg760X, se estimó su origen y el número de generaciones desde el ACMR. Para ello se consideraron once cromosomas portadores de la mutación, incluyendo los dos que tendría el paciente fallecido de la Familia 17. En la tabla 16 se detallan las frecuencias de los alelos fundadores de cada microsatélite en los cromosomas que portan la mutación y en los que no la portan, así como las distancias físicas y las fracciones de recombinación de cada marcador con respecto a la mutación p.Arg760X.

Tabla 16. Frecuencia del alelo fundador de cada microsatélite en cromosomas portadores y no portadores de la mutación p.Arg760X y fracciones de recombinación entre la mutación y cada uno de los marcadores.

Microsatélite	Alelo fundador en cromosomas portadores de la mutación p.Arg760X <sup>1</sup>					
	Nombre del alelo	Frecuencia en cromosomas portadores	Frecuencia en cromosomas sanos	Distancia en Kb	Distancia en cM	Fracción de recombinación <sup>2</sup>
<b>D14S1043</b>	5	0,25	0,16	24	0,03	0,0003
<b>D14S72</b>	3	0,25	0,23	802	1,09	0,0109
<b>D14S742</b>	6	0,50	0,29	2518	3,42	0,0342
<b>D14S581</b>	2	1	0,61			
<b>D14D64</b>	6	1	0,17			
<b>TGM1</b>						
<b>D14S264</b>	8	1	0,13			
<b>D14S1032</b>	4	1	0,43			
<b>D14S275</b>	8	0,667	0,31	1978	2,69	0,0269
<b>D14S1042</b>	1	0,333	0,13	2564	3,49	0,0348
<b>D14S1060</b>	9	0,167	0,18	4155	5,65	0,0563

<sup>1</sup>Se consideró como alelo fundador el alelo con mayor número de repeticiones en la población afecta; <sup>2</sup>Usando la función del mapa de Kosambi.

El tiempo desde el ACMR fue calculado en 42 generaciones por el estimador de Bergman (IC 95% 22-62) y en 25 por el estimador de Risch (IC 95% 13-36) (Tabla 19). Debido a que el alelo 9 del marcador D14S1060 era menos frecuente en población afectada (0,167) que en controles de la población general (0,18), este marcador no aportó ninguna información cuando se usó el método de Bergman. El marcador D14S1043 no pudo ser evaluado por el método de Risch debido a que la frecuencia del alelo presente en la región común era la misma que la del marcador previo. Usando la corrección propuesta por Labuda *et al.* para el método de Risch, la media de generaciones desde el ACMR se incrementó a 36 (IC 95% 21-52).

La edad de la mutación p.Arg760X, de acuerdo con el método Bayesiano implementado con el *software* DMLE, es de aproximadamente 96 generaciones (IC 95% 80-122) (Fig. 65).

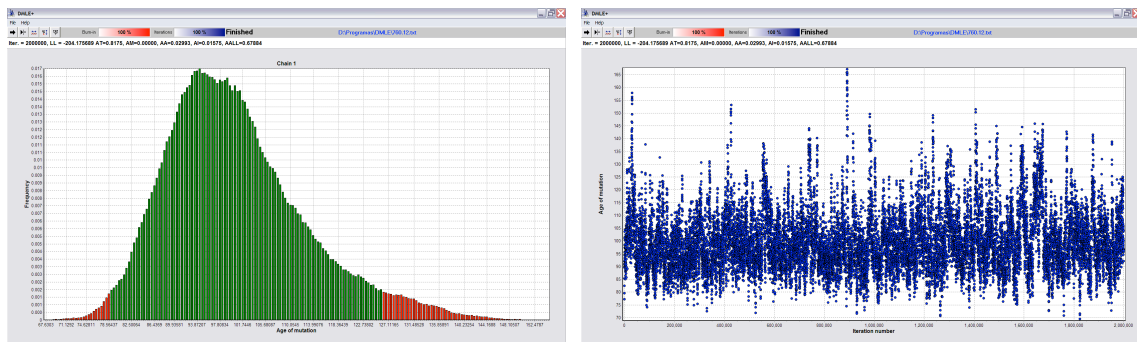


Figura 65. Resultados del *software* DMLE para la mutación p.Arg760X.

#### 4.3.3.2. MUTACIÓN c.1223\_1227delACACA (p.Asp408ValfsX21)

Esta mutación fue encontrada en cuatro familias, en una de ellas en homocigosis (Familia 7). En todos los casos los haplotipos se estudiaron al menos en los probandos y sus padres. Entre los portadores de la mutación, se observó una zona de haplotipo conservado que se extendía 1,33cM incluyendo todos los marcadores intragénicos del gen *TGM1* y trece microsatélites localizados cerca de él (desde el D14S581 al D14S264) (Tabla 18). El hecho de que este haplotipo sea muy raro en la población control, donde solo se ha identificado en el 2% de los casos, apoya la idea de que la mutación c.1223\_1227delACACA es una mutación fundadora.

El número de generaciones desde el ACMR para la mutación c.1223\_1227delACACA fue de 26 generaciones (IC 95% 20-33) según el estimador de Bergman y de 28 (IC 95% 25-31) según el

de Risch. Cuando se aplica a la ecuación de Risch la corrección de Labuda, la media de generaciones aumenta a 41 (IC 95% 35-48) (Tabla 19). La edad de la mutación, según el método DMLE es de 94 generaciones (IC 95% 72-124) (Fig. 66). El marcador D14S1060 no pudo ser usado para la estimación de Risch debido a que la frecuencia del alelo 10 en cromosomas portadores era la misma que la del alelo conservado en el marcador previo. El marcador D14S1043 no pudo ser utilizado ni en el estimador de Risch ni en el de Bergman debido a que la frecuencia del alelo fundador 3 era mayor en población control (0,73) que en población afecta (0,40) y porque la frecuencia de este alelo es igual a la del alelo fundador para el marcador previo. Los datos que se utilizaron para llevar a cabo estas estimaciones se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Frecuencia del alelo fundador de cada microsatélite en cromosomas portadores y no portadores de la mutación c.1223\_1227delACACA y fracciones de recombinación entre la mutación y cada uno de los marcadores.

Microsatélite	Alelo fundador en cromosomas portadores de la mutación c.1223_1227delACACA <sup>1</sup>					
	Nombre del alelo	Frecuencia en cromosomas portadores	Frecuencia en cromosomas sanos	Distancia en Kb	Distancia en cM	Fracción de recombinación <sup>2</sup>
D14S1043	3	0,40	0,73	3352	4,56	0,0455
D14S72	5	0,40	0,07	3329	4,53	0,0451
D14S742	5	0,60	0,37	2527	3,44	0,0343
D14S581	2	0,80	0,61			
D14D64	4	0,60	0,20			
TGM1						
D14S264	5	1	0,31			
D14S1032	4	0,40	0,43	1483	2,02	0,0202
D14S275	6	0,60	0,26	1969	2,68	0,0268
D14S1042	3	0,40	0,23	4533	6,16	0,0613
D14S1060	10	0,40	0,22	8688	11,82	0,1160

<sup>1</sup>Se consideró como alelo fundador el alelo con mayor número de repeticiones en la población afecta; <sup>2</sup>Usando la función del mapa de Kosambi.

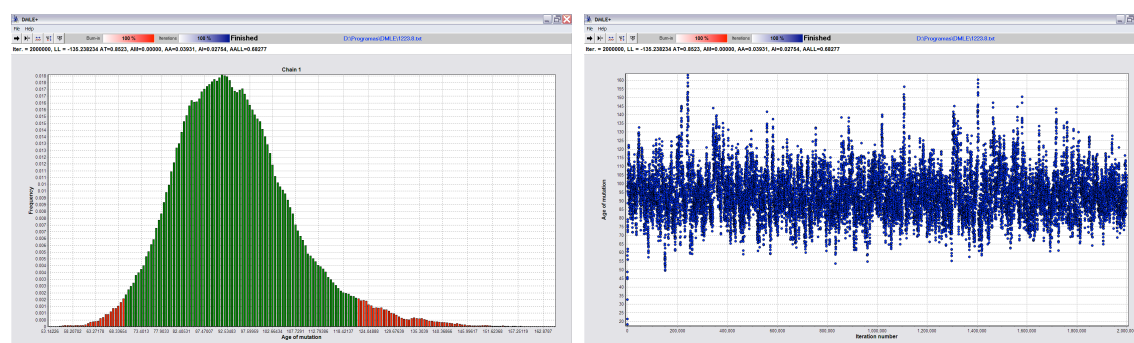


Figura 66. Resultados del *software* DMLE para la mutación c.1223\_1227delACACA.

Tabla 18. Haplotipos de los pacientes en fase. La región conservada se marca en fondo verde.

Mutación	Cromosoma	D14S1060	D14S1042	D14S275	D14S1032	D14S264	rs2281473	rs14193	rs6573653	rs2180196	rs941504	rs3814813	rs3814814	rs2273301	rs2273302	rs17256811	rs7151201	c.984+1G>A	rs1126432	c.1223_1227	rs2748525	rs3742506	rs2273303	c.1559A>G	rs8193032	c.2160C>T	rs1950494	c.2278C>T	rs2229463	rs7158744	D14S64	D14S581	D14S742	D14S72	D14S1043	
p.Arg760X	1.II.1.A	10	7	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	T	6	2	6	3	5
p.Arg760X	1.II.1.B	12	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	T	6	2	3	7	3
p.Arg760X	2.III.1.A	9	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	2	3	3
p.Arg760X	2.III.1.B	10	5	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	7	3	3
p.Arg760X	2.II.2.A	10	6	7	4	6	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	2	3	3
p.Arg760X	3.II.3.A	10	3	5	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	2	3	3
p.Arg760X	3.II.3.B	4	3	5	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	7	3	3
p.Arg760X	4.II.1.A	7	7	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	8	3	3
p.Arg760X	5.II.1.A	8	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	2	3	3
p.Arg760X	6.II.1.A	7	6	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	6	3	3
p.Arg760X	17.I.1.A	9	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	3	5	5
p.Arg760X	17.I.2.A	7	3	7	4	6	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	3	5	5
c.1223_1227del	4.II.1.B	10	3	6	2	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	4	1	3	5	3	3
c.1223_1227del	5.II.1.B	4	6	8	6	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	3	7	7
c.1223_1227del	6.II.1.A	4	6	8	6	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	3	3	4	4
c.1223_1227del	7.II.2.A	10	3	6	4	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	4	2	5	2	3	3
c.1223_1227del	7.II.2.B	9	7	6	4	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	4	2	5	5	3	3
c.984 +1G>A	9.II.1.A	10	8	8	4	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	C	4	2	3	7	3	3
c.984 +1G>A	10.II.1.A	10	3	5	4	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	C	4	2	5	2	3	3
c.984 +1G>A	10.II.1.B	10	1	5	7	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	C	4	2	3	2	3	3

Tabla 19. Estimación de la edad del ACMR y de la edad de las mutaciones (en generaciones) p.Arg760X y c.1223\_1227delACACA mediante los estimadores de Risch *et al.* y Bergman *et al.* y el método Bayesiano implementado con el *software* DMLE.

Mutación	Microsatélite	Alelo fundador	Distancia desde la mutación (Mb)	Estimador de Bergman	Estimador de Risch	Estimador de Risch con corrección de Labuda	DMLE
p.Arg760X	D14S1043	5	3.34	48	-	-	
	D14S72	3	3.32	79	39	60	
	D14S742	6	2.52	35	35	45	
	D14S275	8	1.98	24	24	37	
	D14S1042	1	4.54	23	16	26	
	D14S1060	9	8.7	-	9	14	
<b>Métodos de marcador único: media (IC 95%)</b>							36 (21-52)
<b>Método DMLE: resultado (IC Bayesiano 95%)</b>							96 (80-122)
c.1223_1227delACACA	D14S1043	3	-	-	-	-	
	D14S72	5	3.33	22	31	52	
	D14S742	5	2.53	29	29	39	
	D14S275	6	1.97	28	28	41	
	D14S1042	3	4.53	24	24	34	
	D14S1060	10	8.69	12	-	-	
<b>Método de marcador único: media (IC 95%)</b>							41 (35-48)
<b>Método DMLE: resultado (IC Bayesiano 95%)</b>							94 (72-124)

#### 4.3.3.3. MUTACIÓN c.984+1G>A

Tres pacientes de dos familias aparentemente no relacionadas fueron portadores de esta mutación, uno de ellos en estado homocigoto (Familia 10). En todos los casos se estudiaron al menos el probando y sus padres, excepto en la Familia 9 ya que los padres habían fallecido.

La existencia de un efecto fundador fue también confirmado para la mutación c. 984+1G>A, pues se identificó la existencia de un haplotipo común de 1,42cM (desde D14S742 a D14S1032) ausente en la población control (Tabla 18). Debido al bajo número de cromosomas portadores de la mutación c.984+1G>A no se investigó el número de generaciones desde el ACMR ni la edad de la mutación.

#### 4.4. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Como se muestra en la tabla 20, quince de diecisiete pacientes con fenotipo de IL (88,23%) fueron portadores bialélicos de mutaciones en el gen *TGM1*. Todos los pacientes portadores de mutaciones en el gen *TGM1* tenían un fenotipo de IL y ninguno de los pacientes con EIC presentó mutaciones en este gen. La principal diferencia entre los portadores de mutaciones en este gen y los no portadores fue el tipo de escamas. Se observaron escamas de tipo laminar en todos los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* mientras que solo en uno de los cinco pacientes sin mutaciones en ese gen. Por el contrario, el 80% de los pacientes sin mutaciones presentaron descamación fina.

La presencia de ectropion (93,33%) y membrana colodión (80%) fue más frecuente en los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* que en los pacientes sin ellas (40%). La prematuridad fue también más frecuente (60%) en los pacientes con ICAR y alteraciones en el gen *TGM1*. La frecuencia de alopecia fue levemente más alta en sujetos con mutaciones (66,67%) en comparación con aquellos sin ellas (60%). La afectación de las palmas de las manos y las plantas de los pies y el uso de retinoides sistémicos fueron similares en ambos grupos. La presencia de eritema fue más frecuente (40%) en pacientes sin mutaciones en el gen *TGM1* que en pacientes con ellas (13,33%).

Es importante remarcar que aunque los pacientes 1.II.1, 2.III.1, 2.II.2 y 3.II.3 fueron homocigotos para la misma mutación en el gen *TGM1*, pArg760X, diferían en su aspecto clínico. Los sujetos 1.II.1, 2.II.2 y 3.II.3 habían nacido como bebés colodión y presentaron escamas laminares,

ectropion, alopecia e hiperqueratosis palmoplantar. El paciente 2.III.1 mostró un fenotipo menos severo, sin membrana colodión al nacimiento, ectropion ni alopecia.

Los pacientes 4.II.1, 5.II.1 y 6.II.1 también compartían el mismo genotipo, c.1223\_1227del ACACA/p.Arg760X. Todos ellos habían presentado membrana colodión al nacimiento y tenían escamas de tipo laminar. En el paciente 5.II.1 se observó eritema moderado y alopecia. Por el contrario, los pacientes 4.II.1 y 6.II.1 no presentaron eritema visible y no tenían alopecia (Tabla 9).

El paciente 16.II.1, el único con mutaciones identificadas en el *ALOXE3*, desarrolló un fenotipo menos severo compatible con una EIC. Tenía descamación fina blanquecina y leve eritema generalizado. No presentaba ectropion, alopecia ni queratodermia palmoplantar y no había nacido como bebé colodión.

Tabla 20. Análisis de las características clínicas en portadores y no portadores de mutaciones en el gen *TGM1*.

		Portadores de mutaciones en <i>TGM1</i> (n=15)	No portadores de mutaciones en <i>TGM1</i> (n=5)	p <sup>1</sup>	p corregida <sup>2</sup>
Membrana colodión n (% Pacientes)	Sí (n=14)	12 (80)	2 (40)	0,08437	0,92807
	No (n=5)	2 (13,33)	3 (60)		
	DF (n=1)	1 (6,67)	0		
Prematuridad n (% Pacientes)	Sí (n=11)	9 (60)	2 (40)	0,6027	1
	No (n=8)	5 (33,33)	3 (60)		
	DF (n=1)	1 (6,67)	0		
Escamas laminares n (% Pacientes)	Sí (n=16)	15 (100)	1 (20)	0,00103 <sup>2</sup>	0,01135
	No (n=4)	0	4 (80)		
Escamas finas n (% Pacientes)	Sí (n=4)	0 (0)	4 (80)	0,00103 <sup>2</sup>	0,01135
	No (n=16)	15 (100)	1 (20)		
Color n (% Pacientes)	Negras (n=11)	9 (60)	2 (40)	0,6169	1
	Blancas (n=9)	6 (40)	3 (60)		
Eritema n (% Pacientes)	Sí (n=4)	2 (13,33)	2 (40)	0,2487	1
	No (n=16)	13 (86,67)	3 (60)		
Ectropion n (% Pacientes)	Sí (n=16)	14 (93,33)	2 (40)	0,03199	0,35189
	No (n=4)	1 (6,67)	3 (60)		
Alopecia n (% Pacientes)	Sí (n=13)	10 (66,67)	3 (60)	1	1
	No (n=7)	5 (33,33)	2 (40)		
Queratodermia palmoplantar n (% Pacientes)	Sí (n=17)	13 (86,67)	4 (80)	1	1
	No (n=3)	2 (13,33)	1 (20)		
Tratamiento n (% Pacientes)	Tópico (n=9)	7 (46,67)	2 (40)	1	1
	Sistémico (n=11)	8 (53,33)	3 (60)		
Diagnóstico clínico n (% Pacientes)	IL (n=17)	15 (100)	2 (40)	0,00877	0,09649
	EIC (n=3)	0	3 (60)		

<sup>1</sup>Test exacto de Fisher; <sup>2</sup>Corregido por el test de corrección múltiple de Bonferroni; DF: Datos faltantes.



## 5. DISCUSIÓN

---



Las ICAR son trastornos infrecuentes de la queratinización, que se engloban dentro de las formas de ictiosis hereditaria no sindrómicas. Clásicamente se dividían en IL y EIC. En la nueva clasificación consensuada en el año 2009<sup>2</sup>, se añadió a este grupo la IA, puesto que se ha visto que mutaciones inactivantes en el gen *ABCA12* causan esta entidad<sup>13,14</sup>, mientras que mutaciones *missense* en el mismo gen pueden dar lugar a un fenotipo de IL<sup>15</sup> o EIC<sup>16,17</sup>. Otras variantes menos frecuentes que también se incluyen son el BCAR, el BCARA y la ITB<sup>18-20</sup>.

Clínicamente, los pacientes con IL muestran un fenotipo más severo caracterizado por la presencia de escamas laminares, grandes y oscuras, y la ausencia de eritrodermia. Los pacientes con EIC tienen descamación fina generalizada, habitualmente blanquecina, y un grado variable de eritrodermia<sup>135,136</sup>. Aunque originariamente se pensó que la IL y la EIC eran distintas entidades, se ha visto que existen pacientes con manifestaciones clínicas intermedias y que ambas condiciones pueden ser causadas por mutaciones en el mismo gen<sup>138,139</sup>. Además, pacientes con la misma mutación, incluso dentro de una misma familia, pueden desarrollar distintos fenotipos<sup>133,138</sup>.

En el presente trabajo se estudiaron veinte pacientes con ICAR pertenecientes a dieciséis familias gallegas. Atendiendo a sus características clínicas, diecisiete fueron clasificados como IL y tres como EIC. No se identificó ningún caso de IA, ITB, BCAR ni BCARA. Estas variantes son menos frecuentes y en España suponen tan solo el 7% del total de los casos de ICAR (trabajo pendiente de publicación). Además, el carácter autorresolutivo del BCAR y del BCARA puede hacer que estos pacientes se pierdan en el seguimiento.

Existen pocos datos sobre la epidemiología de las ICAR. En Estados Unidos se ha estimado una prevalencia al nacimiento de 1:100.000 para la IL y 1:200.000 para la EIC ([www.firstskinfoundation.org](http://www.firstskinfoundation.org)). Otros estudios han calculado una prevalencia conjunta para

IL y EIC de 1:200.000-300.000<sup>131,132</sup>. En España la prevalencia calculada podría ser de 1:139.000 (datos pendientes de publicación).

La prevalencia de ICAR estimada en Galicia es de 1:122.000 teniendo en cuenta los 23 sujetos afectos identificados en la región y de 1:138.000 si se consideran solo los veinte pacientes estudiados. La distribución demográfica dentro de Galicia revela que la mayoría de las familias afectadas son originarias de una zona geográfica denominada Rías Baixas (en la costa oeste), que es la zona más densamente poblada de Galicia (750.000 habitantes). Para esta área específica la prevalencia fue de 1:33.000. Como en Galicia no existe ningún centro de referencia para ictiosis y la mayoría de los pacientes no son miembros de la ASIC, podría haber algunos pacientes afectados que no hayan sido reclutados para el estudio. Pensamos que el número de pacientes ocultos es bajo, y en caso de que existan, significaría que la prevalencia real de la enfermedad sería incluso mayor. Como se propuso para Noruega, con una prevalencia de 1:91.000<sup>133</sup>, la alta prevalencia de ICAR en Galicia puede deberse a la presencia de un efecto fundador.

Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en seis genes en los pacientes con ICAR: el *TGM1*, el *ALOX12B*, el *ALOXE3*, el *NIPAL4*, el *CYP4F22* y el *ABCA12*. Fischer *et al.*<sup>113</sup> reunieron 520 familias afectadas de ICAR e identificaron mutaciones en alguno de estos genes en el 78% de ellas. Las mutaciones detectadas se distribuían de la siguiente manera: 32% en el *TGM1*, 16% en el *NIPAL4*, 12% en el *ALOX12B*, 8% en el *CYP4F22*, 5% en el *ALOXE3* y 5% en el *ABCA12*. Eckl *et al.*<sup>155</sup> analizaron otras 250 pacientes con ICAR y encontraron porcentajes similares. El gen *TGM1* fue responsable del 38% de los casos y los genes *ALOX12B* y *ALOXE3* estaban mutados en un 6,8% de los pacientes cada uno de ellos.

Al igual que en los trabajos previos, en nuestros pacientes se identificaron mutaciones en los genes estudiados en el 75% de los probandos. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones en cada gen fue diferente. Las mutaciones en los genes *TGM1* y *ALOXE3* fueron responsables del 68,75% y del 6,25% de los probandos respectivamente y no se encontraron mutaciones en los genes *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22*. No se pudo identificar la mutación causal en cuatro pacientes, lo cual sugiere la implicación del gen *ABCA12* u otros *loci* en su fenotipo.

El gen *TGM1* es responsable de la mayoría de los casos de ICAR<sup>113,155</sup>. Este gen codifica la enzima TGasa 1 que participa en la formación de la envoltura cornificada a nivel de la capa córnea catalizando las uniones cruzadas, dependientes de calcio, de diversas

---

proteínas como la involucrina, la loricrina y las proteínas ricas en prolina<sup>92,159</sup>. En Estados Unidos las mutaciones en este gen son responsables del 55% de los casos de ICAR y en Noruega del 84%<sup>133,165</sup>. Se han identificado mutaciones en todos los exones del gen, pero el 85% de ellas se sitúan en los dos primeros tercios del mismo. El exón 3 es el más frecuentemente afectado, con un 14% de mutaciones, y es seguido por los exones 8 y 7 con un 12% y 11% de mutaciones, respectivamente<sup>166</sup>.

Hasta la fecha, la mutación más frecuentemente detectada en el gen *TGM1* fue la *splice-site* c.877-2A>G, que ha sido encontrada en el 34% de los alelos mutados<sup>166</sup>. Esta mutación fue inicialmente descrita en un paciente suízo con IL<sup>112</sup>. En Noruega, se detectó en el 80% de los alelos mutados en pacientes con IL y EIC<sup>133</sup> y en Estados Unidos también fue la mutación más frecuente, identificándose en un 28% de los alelos alterados<sup>165</sup>. Se ha demostrado que la alta frecuencia de esta mutación en estos países se debe a un efecto fundador<sup>133,167</sup>. También se ha detectado en pacientes con ICAR procedentes de Italia, Alemania y Egipto<sup>138,169,168</sup>.

La segunda mutación más frecuentemente identificada en pacientes con ICAR se localiza en el exón 3 (p.Arg142His). Ésta y otras mutaciones similares han sido descritas en países como Egipto, Alemania y Estados Unidos<sup>112,138,157,165,168,171,172</sup>. En Finlandia, la mutación p.Arg142Cys es la más frecuente y está presente en el 43,33% de los alelos mutados. En este caso, puesto que no se detectó un haplotipo común, parece más probable que esta mutación ocurra en un *hotspot*<sup>173</sup>.

El gen *TGM1* también es responsable de la mayoría de los casos de ICAR en nuestra población. Mutaciones germinales en este gen han sido identificadas en el 68,75% de los pacientes con ICAR y en el 84,62% de los pacientes con IL. Sin embargo, no se identificó ninguna mutación en el gen *TGM1* entre los pacientes con EIC. Por otro lado, ninguno de nuestros pacientes fue portador de la mutación *splice-site* c.877-2A>G ni de la *missense* p.Arg142His. En vez de ellas, se detectaron siete mutaciones diferentes, incluyendo tres *missense* (p.Arg396His, p.Thr491Met y p.Glu520Gly), dos *nonsense* (p.Arg760X y p.Trp263X), una *frameshift* (p.Asp408ValfsX21) y una *splice-site* (c.984+1G>A). Éstas se localizaban en el intrón 6 y en los exones 5, 8, 9, 10, 11 y 15.

Para el análisis de las sustituciones *missense* se llevaron a cabo estudios *in silico* y de modelización molecular. En los estudios *in silico* se emplearon las herramientas bioinformáticas Polyphen, SIFT y Align GVGD. Para la modelización molecular, puesto que

la estructura secundaria y terciaria de la TGasa 1 no ha sido determinada, se emplean habitualmente otras TGasas de estructura conocida como el factor de coagulación humano XIIIa, la TGasa 3 o la combinación de las TGasas 2, 3 y 5. Así, construimos un modelo de TGasa 1 basándonos en su homología con el factor XIIIa. El grado de conservación entre estas dos proteínas es mayor a nivel del dominio *catalytic core* (53%), que en los dominios  *$\beta$ -sandwich* (37%),  *$\beta$ -barrel 1* (32%) y  *$\beta$ -barrel 2* (37%).

La mutación p.Arg396His fue identificada en heterocigosis en dos pacientes de la Familia 9. Esta mutación fue identificada por primera vez por Farasat *et al.*<sup>165</sup>. Se han descrito otros cambios aminoácidos para el codón 396, Arg396Ser<sup>315</sup> y Arg396Leu<sup>173</sup>, lo cual sugiere que este codón puede ser un *hotspot*. El cambio detectado en nuestros pacientes consiste en el paso de una guanina a adenina en la posición 1187, que determina la sustitución de arginina por histidina. Este cambio afecta a un aminoácido altamente conservado en las distintas especies. Por ello, las herramientas bioinformáticas empleadas clasifican la mutación como dañina. La modelización molecular, que predice que el cambio aminoácido puede alterar el plegamiento de la proteína al alterar la formación de puentes de hidrógeno, y la ausencia de esta sustitución en población control también apoyan su patogenicidad.

La sustitución p.Glu520Gly fue detectada en dos de nuestras familias. Consiste en el cambio de adenina por guanina en la posición 1559, que conlleva el cambio de ácido glutámico a glicina en el codón 520. Espósito *et al.*<sup>169</sup> describieron esta mutación en homocigosis en dos hermanos afectados de IL y en heterocigosis en sus padres. Puesto que no detectaron la mutación en 50 controles, concluyeron que era deletérea. En nuestro caso, los sujetos afectados de la Familia 9 eran portadores heterocigotos de tres mutaciones, c.984+1G>A, p.Glu520Gly y p.Arg396His, y el paciente de la Familia 10 era portador homocigoto de c.984+1G>A y p.Glu520Gly. Mediante el estudio de cosegregación en la Familia 9 inferimos que c.984+1G>A y p.Glu520Gly están en el mismo cromosoma. En cuanto a su patogenicidad, los resultados de los estudios *in silico* mostraron discrepancias. Polyphen establece que la mutación es probablemente dañina. Sin embargo, Align GVGD y SIFT la clasifican como menos probable de interfiera con la función y tolerada, respectivamente. Los resultados de la modelización molecular también van en contra de la patogenicidad de esta mutación, pues predicen que el cambio aminoácido no altera el plegado de la proteína puesto que ni el aminoácido original ni el mutado forman puentes de hidrógeno con los residuos adyacentes. La presencia de la mutación en un 1% de la población gallega control tampoco apoya su patogenicidad.

---

La mutación p.Thr491Met fue identificada en homocigosis en dos hermanos de la Familia 10 con un fenotipo severo de IL. Esta mutación, localizada en el exón 10, no había sido previamente descrita en la literatura. Consiste en el cambio de citosina a timina en la posición 1472. Afecta al codón 491, localizado en el dominio *catalytic core*, y determina el cambio de la treonina 491, altamente conservada, a metionina. Estos dos aminoácidos presentan diferentes propiedades físicoquímicas. La treonina es un aminoácido neutro e hidrofílico y la metionina es hidrofóbica. A nivel molecular, la mutación altera el plegamiento de la proteína ya que el nuevo aminoácido intenta plegarse hacia un ambiente más hidrofóbico alterando los puentes de hidrógeno con los residuos próximos. Polyphen y SIFT también clasifican esta mutación como dañina.

La mutación *nonsense* p.Arg760X ha sido previamente descrita fuera de Galicia en una única ocasión por Shevchenko *et al.*<sup>167</sup>, en un varón afroamericano con fenotipo severo de IL, en heterocigosis con la mutación *splice-site* c.877-2A>G. Esta mutación supone un cambio de citosina a timina en la posición nucleotídica 2278. Este cambio afecta al codón 760 en el que la arginina es sustituida por un codón de parada prematuro.

En la TGasa 1 se distinguen cinco dominios proteicos: el dominio de anclaje, el  $\beta$ -sandwich, el *catalytic core*, el  $\beta$ -barrel 1 y el  $\beta$ -barrel 2. La arginina 760 está localizada en el dominio  $\beta$ -barrel 2 y aparece en el interfaz de un dominio próximo al *catalytic core* y al  $\beta$ -sandwich<sup>166</sup>. Las mutaciones en este dominio son infrecuentes. Algunos autores sugieren que el  $\beta$ -barrel 1 y el  $\beta$ -barrel 2, en el extremo C-terminal del gen, incrementan la actividad de la TGasa 1 pero no son esenciales para su función<sup>316,317</sup>.

Hasta la fecha solo se han identificado siete mutaciones situadas en el  $\beta$ -barrel 2: una de ellas en el intrón 13, dos en el exón 14, una en el intrón 14 y las tres restantes en el exón 15 (incluyendo la p.Arg760X)<sup>160,165-167,178,315,318</sup>. La mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos, con la otra mutación afectando al *core domain*<sup>160,167,178</sup>. Espósito *et al.*<sup>318</sup> y Mizrachi-koren *et al.*<sup>315</sup> describieron dos pacientes con mutaciones en homocigosis a nivel del exón 15, de tipo *nonsense* (p.Gln774X) y *missense* (p.Arg764Cys) respectivamente. Dos de los pacientes con mutaciones heterocigotas y uno de los homocigotos presentaban un fenotipo de EIC. El paciente reportado por Espósito *et al.*<sup>318</sup>, aunque tenía un fenotipo de IL presentaba la actividad de la TGasa 1 disminuida pero no abolida. Estos datos han llevado a algunos autores a especular que la pérdida de parte de los dominios C-terminales de la

enzima puede dar lugar a fenotipos clínicos menos severos que otras mutaciones en el mismo gen.

Sin embargo hace unos años reportamos un paciente con un fenotipo de IL severo que era homocigoto para la p.Arg760X<sup>147</sup> y posteriormente se identificaron tres pacientes más portadores homocigotos de la misma mutación y que también exhiben fenotipo severo. Las características clínicas de nuestros pacientes indican que las regiones C-terminales del gen, no solo incrementan la actividad de la enzima TGasa 1, sino que son imprescindibles para su función.

La otra mutación *nonsense* identificada en nuestro estudio fue la p.Trp263X. Se detectó en homocigosis en la Familia 8 y ha sido previamente descrita varias veces en la literatura<sup>161,172,242</sup>. Esta mutación supone el cambio de guanina a adenina en la posición 788, sustituyéndose el triptófano por un codón de parada prematuro. La mutación se sitúa en el exón 5, a nivel del *core domain*, y supone la pérdida de la mayoría de este dominio así como de los dos dominios  $\beta$ -barrel.

La mutación *frameshift* c.1223\_1227delACACA (p.Asp408ValfsX21) fue detectada en cuatro de nuestras familias, en una de ellas en homocigosis (Familia 7). Esta mutación ha sido previamente descrita por Herman *et al.*<sup>166</sup>. Consiste en la delección de cinco aminoácidos situados en la posición nucleotídica 1223-1227, lo cual provoca un cambio del patrón de lectura que conlleva la aparición de un codón de parada prematuro 21 codones más adelante. Se sitúa en el exón 8 a nivel del *core domain*.

La mutación *splice-site* c.984+1G>A fue detectada en dos familias gallegas y había sido previamente descrita por Herman *et al.*<sup>166</sup> en heterocigosis con las mutaciones c.882\_888delCCACGGG y p.Glu520Gly.

De las mutaciones identificadas hasta ahora en el gen *TGM1*, las de tipo *missense* son las más frecuentes y representan el 62% del total. Las mutaciones *nonsense* suponen el 17%, las delecciones el 9% y las inserciones el 6%. Solo ocho (7%) mutaciones *splice-site* han sido descritas hasta el momento en el gen *TGM1* en pacientes con ICAR: la c.1-1G>C, la c.876+2T>C, la c.877-2A>G, la c.984+1G>A, la c.1159+1G>T, la c.1645+1G>A, la c.2088+1G>T y la c.2226-2A>G<sup>166</sup>. De ellas, solo la mutación c.877-2A>G, que es la mutación más frecuente en pacientes con ICAR, ha sido caracterizada mediante análisis de ARN. La c.877-2A>G afecta al sitio aceptor de *splicing* del intrón 5 y da lugar a dos cambios diferentes

---

en el procesamiento del ARNm<sup>167</sup>: la retención de todo el intrón 5<sup>160</sup> y la inserción de un único nucleótido de guanina entre los exones 5 y 6<sup>133</sup>. La presencia de ambos transcritos juntos en portadores homocigotos y heterocigotos de la mutación c.877-2A>G fue confirmada por Shevchenko *et al.*<sup>167</sup>. Las dos variantes conllevan la aparición de un codón de parada prematuro y predicen una proteína truncada.

En nuestro estudio caracterizamos la mutación *splice-site* c.984+1G>A. La disrupción del sitio dador de *splicing* del intrón 6 resulta en la activación de dos sitios crípticos localizados 30 y 32pb más adelante. A nivel proteico, el transcrito aberrante que retiene 30pb del intrón 6 llevaría a la inserción de diez aminoácidos (p.Met329\_Val330ins10). Sin embargo, el transcrito con la inserción de 32pb codificaría para una proteína truncada (p.Val330MetfsX12). Para determinar cómo la inserción p.Met329\_Val330ins10 afecta a la estructura proteica, se modelaron las proteínas TGM1 *wild-type* y mutada con el programa ESyPred3D. La inserción crea un nuevo giro en la superficie del dominio catalítico que es probable que interfiera con el plegamiento de la proteína conduciendo a una estructura modificada que es menos estable y más susceptible a la digestión proteolítica. El efecto patológico de esta mutación también está apoyado por los hallazgos de microscopía electrónica, que son compatibles con una ictiosis congénita tipo 1.

Los genes *ALOXE3* y *ALOX12B* son responsables del 14-17% de las ICAR<sup>113,155</sup> y del 72,2% de los BCAR<sup>143,192,193</sup>. Ambos genes causan un porcentaje similar de casos de la enfermedad. Sin embargo, pocas mutaciones diferentes se han identificado en el gen *ALOXE3* debido a la alta frecuencia de dos mutaciones, la p.Arg234X y la p.Pro630Leu, que han sido detectadas en quince familias de distintos orígenes geográficos y parecen representar *hotspots*<sup>155,188,189</sup>. Estos genes codifican dos LOX epidérmicas que forman parte de la vía de las hepoxilinas, la eLOX-3 y la 12R-LOX. Estas enzimas transforman el ácido araquidónico en hepoxilina A3 que es inestable y se hidroliza a trioxilina A3 en las células<sup>122</sup>. 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.

Se identificaron mutaciones o variantes en el gen *ALOXE3* en dos de nuestros pacientes. Las mutaciones y variaciones detectadas fueron dos *missense* (p.Arg396Ser y p.Leu237Met) y una *splice-site* (p.Arg119GlyfsX12).

Para el análisis de las mutaciones y variantes *missense* en el gen *ALOXE3* se utilizaron las mismas herramientas bioinformáticas (Polyphen, SIFT y Align GVGD). Para la modelización molecular, puesto que la estructura molecular del *ALOXE3* tampoco se conoce, la 15-LOX de conejo se usó como molde, igual que en Eckl *et al.*<sup>189</sup>. Este molde comparte un 36% de las identidades con los aminoácidos del 20 al 663 del *ALOXE3* (NP\_067641.2) mediante el programa de modelización ESyPred3D<sup>300</sup>.

La mutación *missense* p.Arg396Ser fue detectada en heterocigosis en el probando de la Familia 16, que tenía un fenotipo compatible con EIC. Esta mutación había sido previamente descrita por Jobard *et al.*<sup>188</sup> en un paciente norteamericano. Se localiza en el exón 9, a nivel del *catalytic core*. Consiste en el cambio de citosina a adenina en la posición 1886, que conlleva la sustitución de arginina por serina en el codón 396. La modelización molecular predijo que la mutación p.Arg396Ser tiene consecuencias a nivel proteico pues afecta al plegamiento de la proteína. Aunque al cambiarse la arginina por serina se mantiene el puente de hidrógeno que la primera formaba, el cambio de polaridad hace que el nuevo residuo se pliegue hacia el interior de la proteína. La patogenicidad de la mutación es apoyada también por los estudios *in silico*. Todas las herramientas bioinformáticas la clasifican como deletérea.

La variante *missense* p.Leu237Met fue identificada en heterocigosis en el paciente con IL de la Familia 15 sin que se detectara ninguna mutación en el otro alelo. Ha sido previamente descrita como no deletérea<sup>155</sup>. Consiste en el cambio de timina a adenina en la posición 709. Esta timina es un aminoácido débilmente conservado en las distintas especies. El cambio provoca la sustitución de leucina por metionina, dos aminoácidos con las mismas propiedades fisicoquímicas. Tanto los estudios *in silico* como la modelización molecular predicen que esta mutación no es patogénica.

La mutación *splice-site* c.434G>A (p.Arg119GlyfsX12) fue detectada en heterocigosis con la p.Arg396Ser en el probando de la Familia 16. Esta mutación se sitúa en el  $\beta$ -barrel y afecta a la última base del exón 3. Su efecto sobre el *splicing* fue estudiado por Eckl *et al.*<sup>155</sup> en un paciente de Sri Lanka. Mediante estudios de ARN determinaron que la mutación provoca la pérdida de todo el exón 3. Esta pérdida conlleva el cambio del patrón de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro.

De nuestro estudio de pacientes con ICAR de la población gallega llama la atención el alto porcentaje de probandos homocigotos (63,64%) y la alta frecuencia de tres

---

mutaciones en el gen *TGM1*, la p.Arg760X, la c.1223\_1227delACACA y la c.984+1G>A, que representaban el 40,91%, 22,73% y 13,64% de todos los alelos mutados en este gen respectivamente. Estas mutaciones fueron descritas en una única ocasión fuera de Galicia, lo cual sugiere la existencia de episodios históricos de deriva génica en esta región.

Se puede distinguir entre una mutación fundadora y un *hotspot* determinando si la mutación apareció en un trasfondo genético común u ocurrió de forma independiente múltiples veces. Para determinar si las tres mutaciones más frecuentes en Galicia fueron heredadas de un antepasado común se llevó a cabo un análisis de haplotipos usando 21 SNPs situados dentro y en torno al gen *TGM1* y diez microsatélites que se extendían a lo largo de una región de 12Mb alrededor del gen. La identificación de tres haplotipos comunes confirmó que los portadores de las tres mutaciones patogénicas descendían de un antepasado reciente común para cada una de ellas.

Para estimar el número de generaciones transcurridas desde la aparición de estas mutaciones se utilizó un método bayesiano<sup>307</sup>, mientras que dos métodos basados en el desequilibrio de ligamiento fueron empleados para estimar el tiempo desde el ACMR<sup>305,306</sup>. Los métodos que se basan en el desequilibrio de ligamiento tienen una serie de limitaciones como la variación de las frecuencias de recombinación en diferentes mapas genéticos y grupos de población humana y la imposibilidad de obtener estimaciones cuando la frecuencia del alelo fundador en los cromosomas controles es mayor que en los cromosomas portadores de la mutación estudiada. Las estimaciones basadas en la tasa de crecimiento poblacional, como la corrección de Labuda y el DMLE, son también fuentes de variabilidad. Así, por ejemplo, los datos históricos de población, que se basan en registros parroquiales, contienen errores difíciles de estimar. También se asume una tasa de crecimiento constante y exponencial que podría no ser realista. Además, para el cálculo de la proporción de población muestreada, en el método DMLE, hay que asumir la frecuencia de las mutaciones estudiadas en la población actual y los principios de la ecuación de Hardy-Weinberg.

A pesar de estas limitaciones, en nuestra población los diferentes estimadores obtuvieron resultados consistentes entre sí y con la historia demográfica de Galicia.

El número de generaciones desde el ACMR para las mutaciones p.Arg760X y c.1223\_1227delACACA se calculó en el rango de 39 y 34 generaciones respectivamente (calculando la media de los estimadores de Bergman y Risch corregido por Labuda). El origen de la mutación, usando el método DMLE, se estimó en 96 generaciones para la

mutación p.Arg760X y 94 para la c.1223\_1227delACACA. Considerando que el número de años entre generación y generación es de 30<sup>314</sup>, el ACMR dataría de hace 1.000-1.200 años, mientras que el origen de las mutaciones patogénicas podría ser significativamente más antiguo, datando de hace 2.800-2.900 años.

Estos resultados apuntan a la existencia de un fuerte efecto fundador que ocurrió en la población gallega en una época reciente. Las tres mutaciones patogénicas estudiadas se sitúan en tres haplotipos que son infrecuentes o inexistentes en la población general, y en dos de ellos su origen se ha datado en hace aproximadamente 3.000 años. Dos escenarios posibles pueden explicar estos resultados. Las mutaciones en el gen *TGM1*, p.Arg760X y c.1223\_1227delACACA, pudieron surgir en Galicia hace aproximadamente 2.800-2.900 años. Desde su origen se diversificaron en individuos gallegos no relacionados hasta que un cuello de botella poblacional, que ocurrió hace aproximadamente 1.000-1.200 años, redujo la diversidad de los haplotipos de forma que persistieron los que portaban los dos ACMR de los que derivan los actuales haplotipos de las mutaciones p.Arg760X y c.1223\_1227delACACA. Otra alternativa es que estas dos mutaciones hayan sido introducidas por inmigrantes que llegaron a la costa oeste central de Galicia hace 1.000-1.200 años, diversificándose desde entonces hacia los haplotipos observados actualmente.

Se ha estimado que la población de Galicia hace 1.000 años era de aproximadamente 170.000 habitantes (en contraste con los 2,8 millones actuales). Por tanto, cuando las mutaciones aparecieron o llegaron de otras poblaciones, la frecuencia alélica de cada una de ellas sería de 1:340.000 (0,00029%). Las razones por las que estas mutaciones sobrevivieron y aumentaron su frecuencia hasta las altas prevalencias observadas hoy pueden ser varias. Una de ellas puede ser la tendencia de la población gallega, predominantemente rural, a congregarse en pequeñas parroquias aisladas favoreciendo la endogamia. Otra puede ser la existencia de periodos de rápido crecimiento poblacional desde un limitado grupo de fundadores. Está bien documentado un abrupto descenso del número de habitantes de Galicia a mediados del siglo XIV debido a la hambruna y a la peste negra, seguido de consecutivos ciclos de pequeños descensos e incrementos agudos de la población, siendo el más marcado el crecimiento poblacional experimentado en Galicia durante el siglo XVI cuando, de acuerdo con el censo, la población duplicó su tamaño.

Este escenario demográfico podría ir paralelo con el aislamiento relativo de Galicia con respecto al resto de la Península Ibérica debido a su localización y a su compleja

---

orografía (los sinuosos relieves de las montañas del este constituyen barreras geográficas que separan Galicia del resto de la Península). Este aislamiento geográfico condicionó la escasa expansión de la población hacia fuera del territorio, lo que probablemente contribuyó también a mantener estas mutaciones confinadas en Galicia durante siglos. No fue hasta comienzos del siglo pasado cuando existió una migración masiva de la población gallega hacia el exterior (especialmente a Europa Central y Sudamérica). Esta marcada tendencia al aislamiento y la identidad cultural de la región han creado una identidad genética particular<sup>319</sup>. La alta frecuencia de mutaciones fundadoras gallegas descritas hasta la fecha para otras enfermedades también va a favor de este escenario demográfico<sup>320,321</sup>.

En cuanto al origen de ambas mutaciones, su baja frecuencia en otras poblaciones hace más plausible que ambas hayan surgido en el territorio gallego y no que hayan sido introducidas en Galicia por inmigrantes. Las mutaciones p.Arg760X y c.1223\_1227delACACA solo fueron descritas en una ocasión fuera de Galicia. La mutación p.Arg760X fue identificada por Schevchenko *et al.*<sup>167</sup> en un niño afroamericano con IL y la c.1223\_1227delACACA fue descrita por Herman *et al.*<sup>166</sup> en otro paciente estadounidense cuyo grupo étnico y procedencia no fue precisada.

En cuanto a la asociación entre las mutaciones detectadas y las características clínicas de los pacientes, muchos estudios han intentado mostrar asociaciones genotipo-fenotipo entre las mutaciones en el gen *TGM1* y los hallazgos ultraestructurales o las características clínicas sin que hasta la fecha exista una correlación estricta<sup>138,139</sup>.

En general, los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* están más severamente afectados. Un estudio reciente de 104 pacientes con ICAR de los Estados Unidos, mostró que la existencia de mutaciones en el gen *TGM1* se asocia de forma significativa al uso de retinoides sistémicos y a la presencia de membrana colodión al nacimiento, ectropion, alopecia y escamas de tipo laminar<sup>165</sup>. En los pacientes sin mutaciones en este gen se observó una frecuencia ligeramente mayor de eritema, pero sin alcanzar significación estadística. Un estudio previo de 83 pacientes con ICAR de Suecia y Estonia<sup>146</sup> también mostró la asociación de ectropion y membrana colodión a las mutaciones en el gen *TGM1*. Sin embargo, la frecuencia de eritema era mayor en pacientes sin mutaciones. Además se ha visto que las mutaciones truncadoras se asocian más frecuentemente a alteraciones en la sudoración e hipohidrosis que las mutaciones *missense*<sup>165</sup>. En la población norteamericana, se ha desarrollado un modelo basado en los hallazgos clínicos para predecir la probabilidad

de tener mutaciones en el gen *TGM1*: pacientes que nacen con una membrana colodión y que presentan problemas oculares y/o alopecia tienen cuatro veces más probabilidad de presentar mutaciones en ese gen<sup>165</sup>.

De acuerdo con estos estudios, nuestros resultados también sugieren que los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* están más severamente afectados, pues todos los pacientes se clasificaron clínicamente como IL. La membrana colodión al nacimiento, la prematuridad y el ectropion fueron más frecuentes entre los sujetos con mutaciones en el gen *TGM1* y el eritema en los pacientes sin mutaciones. A diferencia de Farasat *et al.*<sup>165</sup>, no se observaron diferencias con respecto a la frecuencia de alopecia. El tipo de escama fue la principal diferencia entre ambos grupos. Mientras todos los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* tenían escamas de tipo laminar, se observó descamación fina en el 80% de los pacientes sin mutaciones en este gen.

A diferencia de los pacientes con déficit de la TGasa 1, los pacientes con mutaciones en los genes *ALOXE3* y *ALOX12B* presentan habitualmente un cuadro clínico menos severo compatible con EIC<sup>188,189,191</sup>. La descamación es leve o moderada y de color blanquecino o marrón claro y pueden asociar eritema. Hasta el 76% de los pacientes nacen como bebés colodión y el 88% presentan alteraciones en la sudoración<sup>155</sup>. Los hallazgos clínicos son independientes de la posición y del tipo de mutación, pero parece existir alguna diferencia entre los pacientes con mutaciones en uno u otro gen. Las mutaciones en el gen *ALOX12B* se asocian a descamación más discreta y blanquecina en comparación con los portadores de mutaciones en el gen *ALOXE3* que tienen escamas marronáceas y adherentes. La presencia de eritema se asocia significativamente a los defectos en el gen *ALOX12B*. Llamativamente, todos los pacientes con mutaciones en el gen *ALOX12B* presentaban hiperqueratosis palmoplantar y acentuación de los pliegues palmoplantares. Por el contrario, solo tres de los pacientes con mutaciones en el gen *ALOXE3* presentaban discreta queratosis palmar o plantar<sup>155</sup>.

El sujeto afecto de la Familia 16 que tenía dos mutaciones en el gen *ALOXE3* mostraba un cuadro clínico leve compatible con el fenotipo de EIC, menos severo que el observado en los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1*. No había nacido como bebé colodión y presentaba en el momento de la exploración descamación fina blanquecina y leve eritema. No tenía ectropion, alopecia ni queratodermia palmoplantar.

De nuestros resultados, también confirmamos el grado de expresión variable de los portadores de mutaciones en el gen *TGM1*. Cuatro de nuestros pacientes eran homocigotos

para la mutación p.Arg760X. Tres de ellos compartían las mismas características clínicas, mientras que el otro presentaba un fenotipo menos severo sin ectropion ni alopecia. Además, otros tres pacientes eran portadores del mismo genotipo c.1223\_1227delACACA/p.Arg760X. Todos ellos presentaron una membrana colodión al nacimiento y tenían escamas de tipo laminar, pero diferían en la presencia de alopecia y eritema.



## 6. RESUMEN



Las ICAR son trastornos de la queratinización infrecuentes que clásicamente se dividen en IL y EIC. Genéticamente son muy heterogéneas. En los últimos años se han identificado mutaciones en seis genes en los pacientes con este trastorno sin que se haya establecido una correlación fenotipo-genotipo estricta. Aunque muchos estudios han descrito mutaciones en estos genes en pacientes o familias con ICAR, pocos trabajos han analizado el espectro de mutaciones en poblaciones específicas.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar las características clínicas y las mutaciones presentes en los genes *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22* en los pacientes con ICAR de Galicia.

Para ello, se llevó a cabo un estudio prospectivo mediante anamnesis, exploración física y recogida de muestras para estudio histopatológico, ultraestructural y genético. Los pacientes se reclutaron a través del contacto con los Servicios de Dermatología de Galicia y con la Asociación Española de Ictiosis. El estudio genético se realizó a partir de ADN y ARN obtenidos de linfocitos de sangre periférica. Se realizó secuenciación directa de los exones y de las zonas intrónicas próximas de los genes a estudio. Las mutaciones de patogenicidad desconocida se clasificaron mediante estudios de ARN y aproximaciones bioinformáticas (estudios *in silico*, modelización molecular).

En la población gallega identificamos 23 pacientes con ICAR pertenecientes a diecisiete familias. La prevalencia estimada de ICAR en Galicia fue de 1:122.000. Si se considerase la zona costera de las Rías Baixas, de donde son originarias la mayoría de las familias, la prevalencia aumentaría hasta 1:33.000. De los veinte pacientes estudiados, diecisiete (85%) se clasificaron clínicamente como IL y tres (15%) como EIC.

Se identificaron mutaciones en los genes *TGM1* y *ALOXE3* en el 75% de las familias gallegas con ICAR, mientras que no se identificó ninguna mutación en los genes *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22*. Las mutaciones en el gen *TGM1* son responsables del 68,75% de los

probandos con ICAR y del 84,62% de los probandos con IL en nuestra población. Se identificaron mutaciones en el gen *ALOXE3* en un único paciente con EIC.

Las mutaciones identificadas en el gen *TGM1* fueron: las mutaciones *nonsense* p.Trp263X y p.Arg760X, la *splice-site* c.984+1G>A, la *frameshift* p.Asp408ValfsX21 y las sustituciones *missense* p.Glu520Gly, p.Arg396His y p.Thr491Met, esta última descrita por primera vez en el presente trabajo. Las mutaciones detectadas en el gen *ALOXE3* fueron la p.Arg119GlyfsX12 y la p.Arg396Ser. También se identificó la variante p.Leu237Met, considerada no deletérea, en un paciente en el que no se detectó ninguna mutación en el otro alelo

Los estudios *in silico* y de modelización molecular permitieron clasificar las mutaciones p.Arg396His y p.Thr491Met en el gen *TGM1* y la p.Arg396Ser en el gen *ALOXE3* como deletéreas y las mutaciones p.Glu520Gly en el gen *TGM1* y p.Leu237Met en el gen *ALOXE3* como no deletéreas.

La mutación *splice-site* c.984+1G>A fue caracterizada mediante estudios de ARN y estudios *in silico*. La pérdida del sitio dador de *splicing* constitutivo conlleva la activación de dos sitios crípticos situados 30 y 32pb más adelante que dan lugar a dos nuevos transcritos que codifican una proteína con la inserción de diez aminoácidos y una proteína truncada, respectivamente.

De forma llamativa, las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227del ACACA y c.984+1G>A en el gen *TGM1* se identificaron en el 81,82% de las familias con mutaciones en ese gen, representando el 70,83% de todos los alelos mutados. El alto porcentaje de pacientes con estas mutaciones, junto con la alta prevalencia detectada en nuestra población y el alto número de probandos homocigotos (63,64%) sugerían la existencia de un fuerte efecto fundador. El estudio de haplotipos confirmó la existencia de este efecto al identificarse haplotipos comunes en los portadores de las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227del ACACA y c.984+1G>A.

Para datar el origen de estas mutaciones se emplearon diferentes ecuaciones. Usando el estimador de Bergman y el de Risch ajustado por la corrección de Labuda, se estimó que la media de generaciones transcurridas desde el ACMR es de 34 para la mutación c.1223\_1227del ACACA y de 39 para la p.Arg760X. Usando el método Bayesiano implementado con el *software* DMLE se estimó que la mutaciones c.1223\_1227del ACACA y p.Arg760X se originaron hace 94 y 96 años respectivamente, es decir, hace 2800-2900 años.

En cuanto a la comparación de las características fenotípicas de los pacientes con y sin mutaciones en el gen *TGM1*, el tipo de escamas fue la principal diferencia entre ambos

grupos. Todos los pacientes con mutaciones bialélicas en el gen *TGM1* tenían escamas de tipo laminar, mientras que se observó descamación fina en el 80% de los pacientes sin mutaciones en este gen. La membrana colodión al nacimiento, la prematuridad y el ectropion fueron más frecuentes en los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1* y el eritema en los pacientes sin mutaciones en este gen. Se observó variabilidad clínica inter e intrafamiliar.

Además, las características clínicas de nuestros pacientes indican que las regiones C-terminales del gen, no solo incrementan la actividad de la enzima TGasa 1, sino que son imprescindibles para su función.



## 7. CONCLUSIONES



**Primera:** Se identificaron 23 pacientes con ICAR pertenecientes a diecisiete familias. Se estimó la prevalencia de ICAR en Galicia en 1:122.000. Si se considerase la zona costera de las Rías Baixas, de donde son originarias la mayoría de las familias, la prevalencia aumentaría hasta 1:33.000.

**Segunda:** De los veinte pacientes estudiados, diecisiete (85%) se clasificaron clínicamente como IL y tres (15%) como EIC.

**Tercera:** Se identificaron mutaciones en los genes *TGM1* y *ALOXE3* en el 75% de las familias gallegas con ICAR, mientras que no se identificó ninguna mutación en los genes *ALOX12B*, *NIPAL4* y *CYP4F22*. Las mutaciones en el gen *TGM1* fueron responsables del 68,75% de los probandos con ICAR y del 84,62% de los probandos con IL en nuestra población. Se identificaron mutaciones en el gen *ALOXE3* en un único paciente con EIC.

**Cuarta:** Los estudios *in silico* y de modelización molecular permitieron clasificar las mutaciones p.Arg396His y p.Thr491Met del gen *TGM1* y la p.Arg396Ser del gen *ALOXE3* como deletéreas y las mutaciones p.Glu520Gly del *TGM1* y p.Leu237Met del *ALOXE3* como no deletéreas.

**Quinta:** La mutación *splice-site* c.984+1G>A fue caracterizada mediante estudios de ARN y estudios *in silico*. La pérdida del sitio dador de *splicing* constitutivo conlleva la activación de dos sitios crípticos situados 30 y 32pb más adelante que dan lugar a dos nuevos transcritos que codifican una proteína con la inserción de diez aminoácidos y una proteína truncada respectivamente.

**Sexta:** Las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227del ACACA y c.984+1G>A del gen *TGM1* se identificaron en el 81,82% de las familias con mutaciones en ese gen, representando el 70,83% de todos los alelos mutados y sugiriendo la existencia de un fuerte efecto

fundador en la población. El estudio de haplotipos confirmó la existencia de este efecto al identificarse haplotipos comunes en los portadores de las mutaciones p.Arg760X, c.1223\_1227del ACACA y c.984+1G>A.

**Séptima:** Se estimó que la media de generaciones transcurridas desde el antepasado común más reciente es de 34 para la mutación c.1223\_1227del ACACA y de 39 para la p.Arg760X. Además, el origen de las mutaciones se estimó en 94 y 96 generaciones respectivamente, es decir, hace 2.800-2.900 años.

**Octava:** La comparación de las características fenotípicas de los pacientes con y sin mutaciones en el gen *TGM1* reveló que el tipo de escamas es la principal diferencia entre ambos grupos. Todos los pacientes con mutaciones bialélicas en el gen *TGM1* tenían escamas de tipo laminar, mientras que se observaba descamación fina en el 80% de los pacientes sin mutaciones en este gen. La membrana colodión al nacimiento, la prematuridad y el ectropion fueron más frecuentes en los pacientes con mutaciones en el gen *TGM1*, mientras que el eritema fue más frecuente en los pacientes sin mutaciones en este gen. Se observó variabilidad clínica inter e intrafamiliar.

**Novena:** Las características clínicas de nuestros pacientes indican que las regiones C-terminales del gen *TGM1*, no solo incrementan la actividad de la enzima TGasa 1, sino que son imprescindibles para su función.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Según las normas de Vancouver (edición 2008). Disponible en <http://www.icmje.org/>

---



1. Traupe H. The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy. Berlín: Springer-Verlag, 1989.
2. Oji V, Tadani G, Akiyama M, Blanchet Bardon C, Bodemer C, Bourrat E, et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63:607-41.
3. Willan R. On cutaneous diseases. Londres: J. Johnson, 1808.
4. Marmelzat WL. Story of the original porcupine men; classic descriptions of ichthyosis hystrix. *Arch Derm Syphilol*. 1948;58:349-53.
5. Penrose LS, Stern C. Reconsideration of the Lambert pedigree (ichthyosis hystrix gravior). *Ann Hum Genet*. 1958;22:258-83.
6. Brocq L. Erythrodermie congénitale ichthyosiforme avec hyperépidermotrophie. *Ann Dermatol Syph (Paris)*. 1902;4:1-31.
7. Frost P, Van Scott EJ. Ichthyosiform dermatoses. Classification based on anatomic and biometric observations. *Arch Dermatol*. 1966;94:113-26.
8. Díaz-Díaz RM. El primer artículo con fotografías de la revista *Actas Dermosifiliográficas*: hiperkeratosis universal congénita maligna (Ictiosis fetal; keratoma maligno congénito, etc.), por Juan de Azúa. *Actas Dermosifiliogr*. 2009;100:287-90.
9. Frost P, Weinstein GD, Van Scott EJ. The ichthyosiform dermatoses. II. Autoradiographic studies of epidermal proliferation. *J Invest Dermatol*. 1966;47:561-7.
10. Traupe H, Kolde G, Happle R. Autosomal dominant lamellar ichthyosis: a new skin disorder. *Clin Genet*. 1984;26:457-61.
11. Toribio J, Fernández Redondo V, Peteiro C, Zulaica A, Fabeiro JM. Autosomal dominant lamellar ichthyosis. *Clin Genet*. 1986;30:122-6.
12. Richard G, Ringpfeil F. Ichthyosis, erythrokeratodermas and related disorders. En: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R et al editors. *Dermatology*. 2nd ed. Philadelphia: Mosby-Elsevier, 2008.
13. Kelsell DP, Norgett EE, Unsworth H, Teh MT, Cullup T, Mein CA, et al. Mutations in ABCA12 underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis. *Am J Hum Genet*. 2005;76:794-803.
14. Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, et al. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by

- corrective gene transfer. *J Clin Invest.* 2005;115:1777-84.
15. Lefèvre C, Audebert S, Jobard F, Bouadjar B, Lakhdar H, Boughdene-Stambouli O, et al. Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2369-78.
  16. Sakai K, Akiyama M, Yanagi T, McMillan JR, Suzuki T, Tsukamoto K, et al. ABCA12 is a major causative gene for non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2306-9.
  17. Natsuga K, Akiyama M, Kato N, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Nishimura M, et al. Novel ABCA12 mutations identified in two cases of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma associated with multiple skin malignant neoplasia. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2669-73.
  18. Raghunath M, Hennies HC, Ahvazi B, Vogel M, Reis A, Steinert PM, et al. Self-healing collodion baby: a dynamic phenotype explained by a particular transglutaminase-1 mutation. *J Invest Dermatol.* 2003;120:224-8.
  19. Mazereeuw-Hautier J, Aufenvenne K, Deraison C, Ahvazi B, Oji V, Traupe H, et al. Acral self-healing collodion baby: report of a new clinical phenotype caused by a novel TGM1 mutation. *Br J Dermatol.* 2009;161:456-63.
  20. Jacyk WK. Bathing-suit ichthyosis. A peculiar phenotype of lamellar ichthyosis in South African blacks. *Eur J Dermatol.* 2005;15:433-6.
  21. Ackerman AB. Histopathologic concept of epidermolytic hyperkeratosis. *Arch Dermatol.* 1970;102:253-9.
  22. Sahn EE, Weimer CE, Garen PD. Annular epidermolytic ichthyosis: a unique phenotype. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27:348-55.
  23. Curth HO, Macklin MT. The genetic basis of various types of ichthyosis in a family group. *Am J Hum Genet.* 1954;6:371-82.
  24. Müller FB, Huber M, Kinaciyan T, Hausser I, Schaffrath C, Krieg T, et al. A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1133-41.
  25. Paller AS, Syder AJ, Chan YM, Yu QC, Hutton E, Tadini G, et al. Genetic and clinical mosaicism in a type of epidermal nevus. *N Engl J Med.* 1994;331:1408-15.
  26. Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Goto M, Nomura Y, Ando S, et al. Keratin 1 gene mutation detected in epidermal nevus with epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1371-4.
  27. Camisa C, Rossana C. Variant of keratoderma hereditaria mutilans (Vohwinkel's syndrome). Treatment with orally administered isotretinoin. *Arch Dermatol.* 1984;120:1323-8.
  28. Korge BP, Ishida-Yamamoto A, Pünter C, Dopping-Hepenstal PJ, Iizuka H, Stephenson A, et al. Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 1997;109:604-10.
  29. Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet.* 1998;20:366-9.
  30. Richard G. Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol.* 2000;9:77-96.

- 
31. Richard G, Brown N, Rouan F, Van der Schroeff JG, Bijlsma E, Eichenfield LF, et al. Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J Invest Dermatol.* 2003;120:601-9.
32. Hacham-Zadeh S, Holubar K. Skin peeling syndrome in a Kurdish family. *Arch Dermatol.* 1985;121:545-6.
33. Cassidy AJ, van Steensel MA, Steijlen PM, van Geel M, van der Velden J, Morley SM, et al. A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;77:909-17.
34. Oji V, Eckl KM, Aufenvenne K, Nätebus M, Tarinski T, Ackermann K, et al. Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet.* 2010;87:274-81.
35. Bowden PE. Peeling skin syndrome: genetic defects in late terminal differentiation of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2011;131:561-4.
36. Brusasco A, Tadini G, Cambiaghi S, Ermacora E, Grimalt R, Caputo R. A case of congenital reticular ichthyosiform erythroderma--ichthyosis 'en confettis'. *Dermatology.* 1994;188:40-5.
37. Brusasco A, Cambiaghi S, Tadini G, Berti E, Caputo R. Unusual hyperpigmentation developing in congenital reticular ichthyosiform erythroderma (ichthyosis variegata). *Br J Dermatol.* 1998;139:893-6.
38. Kronic AL, Palcesky D, Busbey S, Medenica M. Congenital reticular ichthyosiform erythroderma--ichthyosis variegata: a case report and review of the literature. *Acta Derm Venereol.* 2003;83:36-9.
39. Pujol RM, Moreno A, Alomar A, de Moragas JM. Congenital ichthyosiform dermatosis with linear keratotic flexural papules and sclerosing palmoplantar keratoderma. *Arch Dermatol.* 1989;125:103-6.
40. Vahlquist A, Pontén F, Pettersson A. Keratosis linearis with ichthyosis congenita and sclerosing keratoderma (KLICK-syndrome): a rare, autosomal recessive disorder of keratohyaline formation? *Acta Derm Venereol.* 1997;77:225-7.
41. Chaves AJ, Merchán-García R, Fernández-Recio JM, Rodríguez-Nevado I, de Argila D. Queratosis linear con ictiosis congénita y queratoderma esclerosante (síndrome KLICK). *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97:342-4.
42. Dahlqvist J, Klar J, Tiwari N, Schuster J, Törmä H, Badhai J, et al. A single-nucleotide deletion in the POMP 5' UTR causes a transcriptional switch and altered epidermal proteasome distribution in KLICK genodermatosis. *Am J Hum Genet.* 2010;86:596-603.
43. Eramo LR, Esterly NB, Zieserl EJ, Stock EL, Herrmann J. Ichthyosis follicularis with alopecia and photophobia. *Arch Dermatol.* 1985;121:1167-74.
44. Mégarbané H, Zablitz C, Waked N, Lefranc G, Tomb R, Mégarbané A. Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia (IFAP) syndrome: report of a new family with additional features and review. *Am J Med Genet A.* 2004;124:323-7.
45. Oeffner F, Fischer G, Happle R, König A, Betz RC, Bornholdt D, et al. IFAP syndrome is caused by deficiency in MBTPS2, an
-

- intramembrane zinc metalloprotease essential for cholesterol homeostasis and ER stress response. *Am J Hum Genet.* 2009;84:459-67.
46. Braverman N, Lin P, Moebius FF, Obie C, Moser A, Glossmann H, et al. Mutations in the gene encoding 3 beta-hydroxysteroid-delta 8, delta 7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hünermann syndrome. *Nat Genet.* 1999;22:291-4.
47. Steijlen PM, van Geel M, Vreeburg M, Marcus-Soekarman D, Spaapen LJ, Castelijns FC, et al. Novel EBP gene mutations in Conradi-Hünermann-Happle syndrome. *Br J Dermatol.* 2007;157:1225-9.
48. Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lonie L, Bodemer C, Paradisi M, et al. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol.* 2002;118:352-61.
49. Avrahami L, Maas S, Pasmanik-Chor M, Rainshtein L, Magal N, Smitt J, et al. Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis syndrome: further delineation of the phenotype. *Clin Genet.* 2008;74:47-53.
50. Basel-Vanagaite L, Attia R, Ishida-Yamamoto A, Rainshtein L, Ben Amitai D, Lurie R, et al. Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in ST14, encoding type II transmembrane serine protease matriptase. *Am J Hum Genet.* 2007;80:467-77.
51. Alef T, Torres S, Hausser I, Metze D, Türsen U, Lestringant GG, et al. Ichthyosis, follicular atrophoderma, and hypotrichosis caused by mutations in ST14 is associated with impaired profilaggrin processing. *J Invest Dermatol.* 2009;129:862-9.
52. Baala L, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, Hadchouel M, Prost C, Leal SM, et al. Homozygosity mapping of a locus for a novel syndromic ichthyosis to chromosome 3q27-q28. *J Invest Dermatol.* 2002;119:70-6.
53. Feldmeyer L, Huber M, Fellmann F, Beckmann JS, Frenk E, Hohl D. Confirmation of the origin of NISCH syndrome. *Hum Mutat.* 2006;27:408-10.
54. Faghri S, Tamura D, Kraemer KH, Digiovanna JJ. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J Med Genet.* 2008;45:609-21.
55. Morice-Picard F, Cario-André M, Rezvani H, Lacombe D, Sarasin A, Taïeb A. New clinico-genetic classification of trichothiodystrophy. *Am J Med Genet A.* 2009;149:2020-30.
56. Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome. *Semin Dermatol.* 1993;12:210-8.
57. Lacour M. Update on Sjögren-Larsson syndrome. *Dermatology.* 1996;193:77-82.
58. Rizzo WB, Carney G. Sjögren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). *Hum Mutat.* 2005;26:1-10.
59. Wierzbicki AS, Lloyd MD, Schofield CJ, Feher MD, Gibberd FB. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *J Neurochem.* 2002;80:727-35.
60. Saba TG, Montpetit A, Verner A, Rioux P, Hudson TJ, Drouin R, et al. An atypical form of erythrokeratoderma variabilis maps to chromosome 7q22. *Hum Genet.* 2005;116:167-71.

- 
61. Montpetit A, Côté S, Brustein E, Drouin CA, Lapointe L, Boudreau M, et al. Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet.* 2008;4:e1000296.
62. Fujimoto A, Tayebi N, Sidransky E. Congenital ichthyosis preceding neurologic symptoms in two sibs with type 2 Gaucher disease. *Am J Med Genet.* 1995;59:356-8.
63. Schlotawa L, Steinfeld R, von Figura K, Dierks T, Gärtner J. Molecular analysis of SUMF1 mutations: stability and residual activity of mutant formylglycine-generating enzyme determine disease severity in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat.* 2008;29:205.
64. Artigalás OA, da Silva LR, Burin M, Pastores GM, Zeng B, Macedo N, et al. Multiple sulfatase deficiency: clinical report and description of two novel mutations in a Brazilian patient. *Metab Brain Dis.* 2009;24:493-500.
65. Busche A, Hennermann JB, Bürger F, Proquitté H, Dierks T, von Arnim-Baas A, et al. Neonatal manifestation of multiple sulfatase deficiency. *Eur J Pediatr.* 2009;168:969-73.
66. Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, Rapaport D, Goldsher D, Indelman M, et al. A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am J Hum Genet.* 2005;77:242-51.
67. Fuchs-Telem D, Stewart H, Rapaport D, Nousbeck J, Gat A, Gini M, et al. CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br J Dermatol.* 2011;164:610-6.
68. Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forshew T, Cooper WN, et al. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet.* 2004;36:400-4.
69. Choi HJ, Lee MW, Choi JH, Moon KC, Koh JK. Ichthyosis associated with ARC syndrome: ARC syndrome is one of the differential diagnoses of ichthyosis. *Pediatr Dermatol.* 2005;22:539-42.
70. Jang JY, Kim KM, Kim GH, Yu E, Lee JJ, Park YS, et al. Clinical characteristics and VPS33B mutations in patients with ARC syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:348-54.
71. Jan AY, Amin S, Ratajczak P, Richard G, Sybert VP. Genetic heterogeneity of KID syndrome: identification of a Cx30 gene (GJB6) mutation in a patient with KID syndrome and congenital atrichia. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1108-13.
72. Mazereeuw-Hautier J, Bitoun E, Chevrant-Breton J, Man SY, Bodemer C, Prins C, et al. Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: disease expression and spectrum of connexin 26 (GJB2) mutations in 14 patients. *Br J Dermatol.* 2007;156:1015-9.
73. Gonzalez ME, Tloughan BE, Price HN, Patel R, Kamino H, Schaffer JV. Keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome. *Dermatol Online J.* 2009;15:11.
74. Demerjian M, Crumrine DA, Milstone LM, Williams ML, Elias PM. Barrier dysfunction and pathogenesis of neutral lipid storage disease with ichthyosis (Chanarin-Dorfman syndrome). *J Invest Dermatol.* 2006;126:2032-8.
-

- 
75. Selimoglu MA, Esrefoglu M, Gul M, Gungor S, Yildirim C, Seyhan M. Chanarin-Dorfman syndrome: clinical features of a rare lipid metabolism disorder. *Pediatr Dermatol.* 2009;26:40-3.
76. Emre S, Unver N, Evans SE, Yüzbaşıoğlu A, Gürakan F, Gümrük F, et al. Molecular analysis of Chanarin-Dorfman syndrome (CDS) patients: Identification of novel mutations in the ABHD5 gene. *Eur J Med Genet.* 2010;53:141-4.
77. Brusasco A, Gelmetti C, Tadini G, Caputo R. Ichthyosis congenita type IV: a new case resembling diffuse cutaneous mastocytosis. *Br J Dermatol.* 1997;136:377-9.
78. Melin M, Klar J, Jr Gedde-Dahl T, Fredriksson R, Hausser I, Brandrup F, et al. A founder mutation for ichthyosis prematurity syndrome restricted to 76 kb by haplotype association. *J Hum Genet.* 2006;51:864-71.
79. Bygum A, Westermark P, Brandrup F. Ichthyosis prematurity syndrome: a well-defined congenital ichthyosis subtype. *J Am Acad Dermatol.* 2008;59:S71-4.
80. Klar J, Schweiger M, Zimmerman R, Zechner R, Li H, Törmä H, et al. Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. *Am J Hum Genet.* 2009;85:248-53.
81. Akiyama M, Shimizu H. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Exp Dermatol.* 2008;17:373-82.
82. Hernández-Martín. Avances biomoleculares en los trastornos epidérmicos hereditarios. 2005;96:203-16.
83. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:328-40.
84. Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin TM. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:19-26.
85. Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 2010;429:419-33.
86. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129:705-33.
87. Langbein L, Schweizer J. Keratins of the human hair follicle. *Int Rev Cytol.* 2005;243:1-78.
88. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:383-408.
89. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol.* 1996;106:989-92.
90. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med.* 1999;31:5-19.
91. Roop D. Defects in the barrier. *Science.* 1995;267:474-5.
92. Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays.* 2002;24:789-800.
93. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with
-

- pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:140-56.
94. Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, et al. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci.* 2004;117:2295-307.
95. Marekov LN, Steinert PM. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 1998;273:17763-70.
96. Elias PM, Williams ML, Holleran WM, Jiang YJ, Schmuth M. Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2008;49:697-714.
97. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res.* 2003;42:1-36.
98. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Colton SW, Abraham W, Strauss JS. Skin lipids: an update. *J Invest Dermatol.* 1987;88:2s-6s.
99. Sato J, Denda M, Nakanishi J, Nomura J, Koyama J. Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1998;111:189-93.
100. Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci.* 2003;31:81-9.
101. Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:839-42.
102. Arin MJ, Oji V, Emmert S, Hausser I, Traupe H, Krieg T, et al. Expanding the keratin mutation database: novel and recurrent mutations and genotype-phenotype correlations in 28 patients with epidermolytic ichthyosis. *Br J Dermatol.* 2011;164:442-7.
103. Suga Y, Duncan KO, Heald PW, Roop DR. A novel helix termination mutation in keratin 10 in annular epidermolytic ichthyosis, a variant of bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *J Invest Dermatol.* 1998;111:1220-3.
104. Sheth N, Greenblatt D, McGrath JA. New KRT10 gene mutation underlying the annular variant of bullous congenital ichthyosiform erythroderma with clinical worsening during pregnancy. *Br J Dermatol.* 2007;157:602-4.
105. Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Becker OM, Marekov L, Miller CJ, Steinert PM, et al. Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. *J Invest Dermatol.* 2001;116:511-9.
106. Ishida-Yamamoto A, Richard G, Takahashi H, Iizuka H. In vivo studies of mutant keratin 1 in ichthyosis hystrix Curth-Macklin. *J Invest Dermatol.* 2003;120:498-500.
107. Rothnagel JA, Traupe H, Wojcik S, Huber M, Hohl D, Pittelkow MR, et al. Mutations in the rod domain of keratin 2e in patients with ichthyosis bullosa of Siemens. *Nat Genet.* 1994;7:485-90.
108. McLean WH, Morley SM, Lane EB, Eady RA, Griffiths WA, Paige DG, et al. Ichthyosis bullosa of Siemens--a disease involving keratin 2e. *J Invest Dermatol.* 1994;103:277-81.
109. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet.* 2006;38:337-42.
110. Nomura T, Sandilands A, Akiyama M, Liao H, Evans AT, Sakai K, et al. Unique mutations in

- the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:434-40.
111. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, et al. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol.* 2008;128:1436-41.
112. Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SP, Ponc M, et al. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science.* 1995;267:525-8.
113. Fischer J. Autosomal recessive congenital ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1319-21.
114. Kharfi M, El Fekih N, Ammar D, Jaafoura H, Schwonbeck S, van Steensel MA, et al. A missense mutation in TGM5 causes acral peeling skin syndrome in a Tunisian family. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2512-5.
115. Maestrini E, Monaco AP, McGrath JA, Ishida-Yamamoto A, Camisa C, Hovnanian A, et al. A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nat Genet.* 1996;13:70-7.
116. Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Lam H, Iizuka H, Friedman RA, Christiano AM. The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *Am J Hum Genet.* 1997;61:581-9.
117. Nemes Z, Demény M, Marek LN, Fésüs L, Steinert PM. Cholesterol 3-sulfate interferes with cornified envelope assembly by diverting transglutaminase 1 activity from the formation of cross-links and esters to the hydrolysis of glutamine. *J Biol Chem.* 2000;275:2636-46.
118. Brash AR, Yu Z, Boeglin WE, Schneider C. The hepxilin connection in the epidermis. *FEBS J.* 2007;274:3494-502.
119. Lefèvre C, Bouadjar B, Karaduman A, Jobard F, Saker S, Ozguc M, et al. Mutations in ichthyin a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2473-82.
120. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Epidermal lipoxygenase products of the hepxilin pathway selectively activate the nuclear receptor PPARalpha. *Lipids.* 2007;42:491-7.
121. Lefèvre C, Bouadjar B, Ferrand V, Tadini G, Mégarbané A, Lathrop M, et al. Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3. *Hum Mol Genet.* 2006;15:767-76.
122. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Mutations associated with a congenital form of ichthyosis (NCIE) inactivate the epidermal lipoxygenases 12R-LOX and eLOX3. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1686:238-47.
123. König A, Happel R, Bornholdt D, Engel H, Grzeschik KH. Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;90:339-46.
124. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 2006;3:309-19.
125. Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M, Shimizu H. Truncation of CGI-58 protein causes malformation of lamellar granules

- resulting in ichthyosis in Dorfman-Chanarin syndrome. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1029-34.
126. Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJ. Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum Mutat.* 2004;23:209-18.
127. Rizzo WB, S'Aulis D, Jennings MA, Crumrine DA, Williams ML, Elias PM. Ichthyosis in Sjögren-Larsson syndrome reflects defective barrier function due to abnormal lamellar body structure and secretion. *Arch Dermatol Res.* 2010;302:443-51.
128. Takayama K, Salazar EP, Broughton BC, Lehmann AR, Sarasin A, Thompson LH, et al. Defects in the DNA repair and transcription gene ERCC2(XPD) in trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet.* 1996;58:263-70.
129. Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, et al. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet.* 1997;60:320-9.
130. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology.* 2004;127:1386-90.
131. Bale SJ, Doyle SZ. The genetics of ichthyosis: a primer for epidemiologists. *J Invest Dermatol.* 1994;102:49S-50S.
132. Bale SJ, Richard G. Autosomal Recessive Congenital ichthyosis. En: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews.* Seattle (WA): University of Washington, 2009.
133. Pigg M, Gedde-Dahl T, Cox D, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Dahl N. Strong founder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet.* 1998;6:589-96.
134. Kolde G, Happle R, Traupe H. Autosomal-dominant lamellar ichthyosis: ultrastructural characteristics of a new type of congenital ichthyosis. *Arch Dermatol Res.* 1985;278:1-5.
135. Williams ML, Elias PM. Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol.* 1985;121:477-88.
136. Hazell M, Marks R. Clinical, histologic, and cell kinetic discriminants between lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol.* 1985;121:489-93.
137. Peña-Peñabaz C, García-Silva J, de Unamuno-Pérez P. Estudio clínico e histopatológico de 17 casos de ictiosis laminar. *Actas Dermosifiliograficas.* 1996;87:381-90.
138. Hennies HC, Küster W, Wiebe V, Krebsová A, Reis A. Genotype/phenotype correlation in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1052-61.
139. Laiho E, Niemi KM, Ignatius J, Kere J, Palotie A, Saarialho-Kere U. Clinical and morphological correlations for transglutaminase 1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis. *Eur J Hum Genet.* 1999;7:625-32.
140. Niemi KM, Kanerva L, Kuokkanen K, Ignatius J. Clinical, light and electron microscopic features of recessive congenital ichthyosis type I. *Br J Dermatol.* 1994;130:626-33.

- 
141. Niemi KM, Kanerva L, Kuokkanen K. Recessive ichthyosis congenita type II. *Arch Dermatol Res.* 1991;283:211-8.
142. Niemi KM, Kanerva L, Wahlgren CF, Ignatius J. Clinical, light and electron microscopic features of recessive ichthyosis congenita type III. *Arch Dermatol Res.* 1992;284:259-65.
143. Harting M, Brunetti-Pierri N, Chan CS, Kirby J, Dishop MK, Richard G, et al. Self-healing collodion membrane and mild nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma due to 2 novel mutations in the ALOX12B gene. *Arch Dermatol.* 2008;144:351-6.
144. Akiyama M, Sakai K, Yanagi T, Tabata N, Yamada M, Shimizu H. Partially disturbed lamellar granule secretion in mild congenital ichthyosiform erythroderma with ALOX12B mutations. *Br J Dermatol.* 2010;163:201-4.
145. Kanerva L, Lauharanta J, Niemi KM, Lassus A. New observations on the fine structure of lamellar ichthyosis and the effect of treatment with etretinate. *Am J Dermatopathol.* 1983;5:555-68.
146. Gånemo A, Pigg M, Virtanen M, Kukk T, Raudsepp H, Rossman-Ringdahl I, et al. Autosomal recessive congenital ichthyosis in Sweden and Estonia: clinical, genetic and ultrastructural findings in eighty-three patients. *Acta Derm Venereol.* 2003;83:24-30.
147. Rodríguez-Pazos L, Ginarte M, Vega-Gliemmo A, Toribio J. Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the transglutaminase-1 gene. *Int J Dermatol.* 2009;48:1195-7.
148. Yotsumoto S, Akiyama M, Yoneda K, Fukushima T, Kobayashi K, Saheki T, et al. Analyses of the transglutaminase 1 gene mutation and ultrastructural characteristics in a Japanese patient with lamellar ichthyosis. *J Dermatol Sci.* 2000;24:119-25.
149. Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, 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;95:1044-9.
150. Arnold ML, Anton-Lamprecht I, Melz-Rothfuss B, Hartschuh W. Ichthyosis congenita type III. Clinical and ultrastructural characteristics and distinction within the heterogeneous ichthyosis congenita group. *Arch Dermatol Res.* 1988;280:268-78.
151. de Wolf K, Gourdain JM, Dobbeleer GD, Song M. A particular subtype of ichthyosis congenita type III. Clinical, light, and electron microscopic features. *Am J Dermatopathol.* 1995;17:606-11.
152. Niemi KM, Kanerva L. Ichthyosis with laminated membrane structures. *Am J Dermatopathol.* 1989;11:149-56.
153. Dahlqvist J, Klar J, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Pigg MH, Gedde-Dahl T, et al. Congenital ichthyosis: mutations in ichthyin are associated with specific structural abnormalities in the granular layer of epidermis. *J Med Genet.* 2007;44:615-20.
154. Niemi KM, Kuokkanen K, Kanerva L, Ignatius J. Recessive ichthyosis congenita type IV. *Am J Dermatopathol.* 1993;15:224-8.
155. Eckl KM, de Juanes S, Kurtenbach J, Nätebus M, Lugassy J, Oji V, 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;129:1421-8.
156. Russell LJ, DiGiovanna JJ, Hashem N, Compton JG, Bale SJ. Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q. *Am J Hum Genet.* 1994;55:1146-52.
157. Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, Steinert PM, Hashem N, Compton JG, et al. Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Genet.* 1995;9:279-83.
158. Facchiano A, Facchiano F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids.* 2009;36:599-614.
159. Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL. 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;272:12035-46.
160. Huber M, Yee VC, Burri N, Vikerfors E, Lavrijsen AP, Paller AS, et al. Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase. *J Biol Chem.* 1997;272:21018-26.
161. Hennies HC, Raghunath M, Wiebe V, Vogel M, Velten F, Traupe H, et al. Genetic and immunohistochemical detection of mutations inactivating the keratinocyte transglutaminase in patients with lamellar ichthyosis. *Hum Genet.* 1998;102:314-8.
162. Hohl D, Aeschlimann D, Huber M. In vitro and rapid in situ transglutaminase assays for congenital ichthyoses--a comparative study. *J Invest Dermatol.* 1998;110:268-71.
163. Akiyama M, Takizawa Y, Suzuki Y, Shimizu H. A novel homozygous mutation 371delA in TGM1 leads to a classic lamellar ichthyosis phenotype. *Br J Dermatol.* 2003;148:149-53.
164. Rice RH, Crumrine D, Uchida Y, Gruber R, Elias PM. Structural changes in epidermal scale and appendages as indicators of defective TGM1 activity. *Arch Dermatol Res.* 2005;297:127-33.
165. Farasat S, Wei MH, Herman M, Liewehr DJ, Steinberg SM, Bale SJ, 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;46:103-11.
166. Herman ML, Farasat S, Steinbach PJ, Wei MH, Toure O, Fleckman P, 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;30:537-47.
167. Shevchenko YO, Compton JG, Toro JR, DiGiovanna JJ, Bale SJ. Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies. *Hum Genet.* 2000;106:492-9.
168. Shawky RM, Sayed NS, Elhawary NA. Mutations in transglutaminase 1 gene in autosomal recessive congenital ichthyosis in Egyptian families. *Dis Markers.* 2004;20:325-32.
169. Esposito G, Auricchio L, Rescigno G, Paparo F, Rinaldi M, Salvatore F. Transglutaminase 1 gene mutations in Italian patients with autosomal recessive lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2001;116:809-12.
170. Petit E, Huber M, Rochat A, Bodemer C, Teillac-Hamel D, Müh JP, 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;5:218-28.
171. Parmentier L, Blanchet-Bardon C, Nguyen S, Prud'homme JF, Dubertret L, Weissenbach J. Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1391-5.
172. Cserhalmi-Friedman PB, Milstone LM, Christiano AM. Diagnosis of autosomal recessive lamellar ichthyosis with mutations in the TGM1 gene. *Br J Dermatol.* 2001;144:726-30.
173. Laiho E, Ignatius J, Mikkola H, Yee VC, Teller DC, Niemi KM, et al. Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *Am J Hum Genet.* 1997;61:529-38.
174. Tok J, Garzon MC, Cserhalmi-Friedman P, Lam HM, Spitz JL, Christiano AM. Identification of mutations in the transglutaminase 1 gene in lamellar ichthyosis. *Exp Dermatol.* 1999;8:128-33.
175. Jessen BA, Phillips MA, Hovnanian A, Rice RH. Role of Sp1 response element in transcription of the human transglutaminase 1 gene. *J Invest Dermatol.* 2000;115:113-7.
176. Kon A, Takeda H, Sasaki H, Yoneda K, Nomura K, Ahvazi B, et al. Novel transglutaminase 1 gene mutations (R348X/Y365D) in a Japanese family with lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2003;120:170-2.
177. Lugassy J, Hennies HC, Indelman M, Khamaysi Z, Bergman R, Sprecher E. Rapid detection of homozygous mutations in congenital recessive ichthyosis. *Arch Dermatol Res.* 2008;300:81-5.
178. Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, Shimizu H. Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol.* 2001;144:401-7.
179. Becker K, Csikós M, Sárdy M, Szalai ZS, Horváth A, Kárpáti S. Identification of two novel nonsense mutations in the transglutaminase 1 gene in a Hungarian patient with congenital ichthyosiform erythroderma. *Exp Dermatol.* 2003;12:324-9.
180. Krieg P, Marks F, Fürstenberger G. A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics.* 2001;73:323-30.
181. Fürstenberger G, Epp N, Eckl KM, Hennies HC, Jørgensen C, Hallenborg P, et al. Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82:128-34.
182. Heidt M, Fürstenberger G, Vogel S, Marks F, Krieg P. Diversity of mouse lipoxygenases: identification of a subfamily of epidermal isozymes exhibiting a differentiation-dependent mRNA expression pattern. *Lipids.* 2000;35:701-7.
183. Boeglin WE, Kim RB, Brash AR. A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6744-9.
184. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Marnett LJ, Brash AR. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:9162-7.
185. Pace-Asciak CR, Reynaud D, Demin P, Nigam S. The hepoxilins. A review. *Adv Exp Med Biol.* 1999;447:123-32.

- 
186. de Juanes S, Epp N, Latzko S, Neumann M, Fürstenberger G, Hausser I, et al. Development of an ichthyosiform phenotype in Alox12b-deficient mouse skin transplants. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1429-36.
187. Krebsová A, Küster W, Lestringant GG, Schulze B, Hinz B, Frossard PM, 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;69:216-22.
188. Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, 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;11:107-13.
189. Eckl KM, Krieg P, Küster W, Traupe H, André F, Wittstruck N, et al. Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mutat.* 2005;26:351-61.
190. Ashoor G, Massé M, García Luciano LM, Sheffer R, Martinez-Mir A, Christiano AM, et al. A novel mutation in the 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) gene underlies nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol.* 2006;155:198-200.
191. Lesueur F, Bouadjar B, Lefèvre C, Jobard F, Audebert S, Lakhdar H, 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;127:829-34.
192. Vahlquist A, Bygum A, Gånemo A, Virtanen M, Hellström-Pigg M, Strauss G, et al. Genotypic and clinical spectrum of self-improving collodion ichthyosis: ALOX12B, ALOXE3, and TGM1 mutations in Scandinavian patients. *J Invest Dermatol.* 2010;130:438-43.
193. Kurban M, Shimomura Y, Bahhady R, Ghosn S, Kibbi AG, Christiano AM. Nonsense mutation in the ALOX12B gene leads to autosomal recessive congenital ichthyosis in a Lebanese family. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24:232-4.
194. Epp N, Fürstenberger G, Müller K, de Juanes S, Leitges M, Hausser I, et al. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol.* 2007;177:173-82.
195. Moran JL, Qiu H, Turbe-Doan A, Yun Y, Boeglin WE, Brash AR, et al. A mouse mutation in the 12R-lipoxygenase, Alox12b, disrupts formation of the epidermal permeability barrier. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1893-7.
196. Wajid M, Kurban M, Shimomura Y, Christiano AM. NIPAL4/ichthyin is expressed in the granular layer of human epidermis and mutated in two Pakistani families with autosomal recessive ichthyosis. *Dermatology.* 2010;220:8-14.
197. Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, Guitard M, Rotman S, Breiden B, et al. The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol.* 2005;170:487-96.
198. Hewett DR, Simons AL, Mangan NE, Jolin HE, Green SM, Fallon PG, et al. Lethal, neonatal ichthyosis with increased proteolytic processing of filaggrin in a mouse model of Netherton syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14:335-46.
-

- 
199. Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell*. 2007;18:3607-19.
200. Virolainen E, Wessman M, Hovatta I, Niemi KM, Ignatius J, Kere J, et al. Assignment of a novel locus for autosomal recessive congenital ichthyosis to chromosome 19p13.1-p13.2. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1132-7.
201. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004;14:1-18.
202. Kikuta Y, Kusunose E, Kusunose M. Prostaglandin and leukotriene omega-hydroxylases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68-69:345-62.
203. Jedlitschky G, Huber M, Völkl A, Müller M, Leier I, Müller J, et al. Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end. *J Biol Chem*. 1991;266:24763-72.
204. Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33:475-9.
205. Sakai K, Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H. Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2007;16:920-6.
206. Akiyama M. Pathomechanisms of harlequin ichthyosis and ABCA transporters in human diseases. *Arch Dermatol*. 2006;142:914-8.
207. Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*. 2004;350:1296-303.
208. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett*. 2001;508:221-5.
209. Zuo Y, Zhuang DZ, Han R, Isaac G, Tobin JJ, McKee M, et al. ABCA12 maintains the epidermal lipid permeability barrier by facilitating formation of ceramide linoleic esters. *J Biol Chem*. 2008;283:36624-35.
210. Akiyama M. Harlequin ichthyosis and other autosomal recessive congenital ichthyoses: the underlying genetic defects and pathomechanisms. *J Dermatol Sci*. 2006;42:83-9.
211. Thomas AC, Tattersall D, Norgett EE, O'Toole EA, Kelsell DP. Premature terminal differentiation and a reduction in specific proteases associated with loss of ABCA12 in Harlequin ichthyosis. *Am J Pathol*. 2009;174:970-8.
212. Smyth I, Hacking DF, Hilton AA, Mukhamedova N, Meikle PJ, Ellis S, et al. A mouse model of harlequin ichthyosis delineates a key role for Abca12 in lipid homeostasis. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000192.
213. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Ishikawa J, Sakai K, Miyamura Y, et al. Self-improvement of keratinocyte differentiation defects during skin maturation in ABCA12-deficient harlequin ichthyosis model mice. *Am J Pathol*. 2010;177:106-18.
214. Thomas AC, Cullup T, Norgett EE, Hill T, Barton S, Dale BA, et al. ABCA12 is the major harlequin ichthyosis gene. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2408-13.
-

215. Thomas AC, Sinclair C, Mahmud N, Cullup T, Mellerio JE, Harper J, et al. Novel and recurring ABCA12 mutations associated with harlequin ichthyosis: implications for prenatal diagnosis. *Br J Dermatol*. 2008;158:611-3.
216. Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, et al. Compound heterozygous mutations including a de novo missense mutation in ABCA12 led to a case of harlequin ichthyosis with moderate clinical severity. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1518-23.
217. Rajpar SF, Cullup T, Kelsell DP, Moss C. A novel ABCA12 mutation underlying a case of Harlequin ichthyosis. *Br J Dermatol*. 2006;155:204-6.
218. Akiyama M, Sakai K, Sato T, McMillan JR, Goto M, Sawamura D, et al. Compound heterozygous ABCA12 mutations including a novel nonsense mutation underlie harlequin ichthyosis. *Dermatology*. 2007;215:155-9.
219. Castiglia D, Castori M, Pisaneschi E, Sommi M, Covaciu C, Zambruno G, et al. Trisomic rescue causing reduction to homozygosity for a novel ABCA12 mutation in harlequin ichthyosis. *Clin Genet*. 2009;76:392-7.
220. Akiyama M, Titeux M, Sakai K, McMillan JR, Tonasso L, Calvas P, et al. DNA-based prenatal diagnosis of harlequin ichthyosis and characterization of ABCA12 mutation consequences. *J Invest Dermatol*. 2007;127:568-73.
221. Akiyama M, Sakai K, Hatamochi A, Yamazaki S, McMillan JR, Shimizu H. Novel compound heterozygous nonsense and missense ABCA12 mutations lead to nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol*. 2008;158:864-7.
222. Akiyama M. ABCA12 mutations and autosomal recessive congenital ichthyosis: a review of genotype/phenotype correlations and of pathogenetic concepts. *Hum Mutat*. 2010;31:1090-6.
223. Rajpopat S, Moss C, Mellerio J, Vahlquist A, Gånemo A, Hellstrom-Pigg M, et al. Harlequin Ichthyosis: A Review of Clinical and Molecular Findings in 45 Cases. *Arch Dermatol*. 2011. doi:10.1001/archdermatol.2011.9
224. Harvey HB, Shaw MG, Morrell DS. Perinatal management of harlequin ichthyosis: a case report and literature review. *J Perinatol*. 2010;30:66-72.
225. Haftek M, Cambazard F, Dhouailly D, Réano A, Simon M, Lachaux A, et al. A longitudinal study of a harlequin infant presenting clinically as non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol*. 1996;135:448-53.
226. Umemoto H, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Aoyama Y, Oizumi A, et al. New insight into genotype/phenotype correlations in ABCA12 mutations in harlequin ichthyosis. *J Dermatol Sci*. 2011;61:136-9.
227. Dale BA, Holbrook KA, Fleckman P, Kimball JR, Brumbaugh S, Sybert VP. Heterogeneity in harlequin ichthyosis, an inborn error of epidermal keratinization: variable morphology and structural protein expression and a defect in lamellar granules. *J Invest Dermatol*. 1990;94:6-18.
228. Milner ME, O'Guin WM, Holbrook KA, Dale BA. Abnormal lamellar granules in harlequin ichthyosis. *J Invest Dermatol*. 1992;99:824-9.
229. Virolainen E, Niemi KM, Gånemo A, Kere J, Vahlquist A, Saarialho-Kere U. Ultrastructural

- features resembling those of harlequin ichthyosis in patients with severe congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol.* 2001;145:480-3.
230. Van Gysel D, Lijnen RL, Moekti SS, de Laat PC, Oranje AP. Collodion baby: a follow-up study of 17 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16:472-5.
231. Buyse L, Graves C, Marks R, Wijeyesekera K, Alfaham M, Finlay AY. Collodion baby dehydration: the danger of high transepidermal water loss. *Br J Dermatol.* 1993;129:86-8.
232. Larrègue M, Guillet G. Bébé collodion révélant une trichothiodystrophie confondue avec un syndrome de Netherton: réévaluation d'une erreur de diagnostic. *Ann Dermatol Venereol.* 2007;134:245-8.
233. Thomas C, Suranyi E, Pride H, Tyler W. A child with hypohidrotic ectodermal dysplasia with features of a collodion membrane. *Pediatr Dermatol.* 2006;23:251-4.
234. Reed WB, Herwick RP, Harville D, Porter PS, Conant M. Lamellar ichthyosis of the newborn. A distinct clinical entity: its comparison to the other ichthyosiform erythrodermas. *Arch Dermatol.* 1972;105:394-9.
235. Frenk E, de Techtermann F. Self-healing collodion baby: evidence for autosomal recessive inheritance. *Pediatr Dermatol.* 1992;9:95-7.
236. Frenk E, Mevorah B. The keratinization disorder in collodion babies evolving into lamellar ichthyosis. Its possible relevance for determining the primary defect in lamellar ichthyosis. *J Cutan Pathol.* 1977;4:329-37.
237. Frenk E. A spontaneously healing collodion baby: a light and electron microscopical study. *Acta Derm Venereol.* 1981;61:168-71.
238. Hackett BC, Fitzgerald D, Watson RM, Hol FA, Irvine AD. 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;162:448-51.
239. Finlay HV, Bound JP. Collodion skin in the neonate due to lamellar ichthyosis. *Arch Dis Child.* 1952;27:438-41.
240. Muramatsu S, Suga Y, Kon J, Matsuba S, Hashimoto Y, Ogawa H. 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;150:390-2.
241. Yang JM, Ahn KS, Cho MO, Yoneda K, Lee CH, Lee JH, et al. Novel mutations of the transglutaminase 1 gene in lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:214-8.
242. Oji V, Hautier JM, Ahvazi B, Hausser I, Aufenvenne K, Walker T, et al. Bathing suit ichthyosis is caused by transglutaminase-1 deficiency: evidence for a temperature-sensitive phenotype. *Hum Mol Genet.* 2006;15:3083-97.
243. Trindade F, Fiadeiro T, Torrelo A, Hennies HC, Hausser I, Traupe H. Bathing suit ichthyosis. *Eur J Dermatol.* 2010;20:447-50.
244. Arita K, Jacyk WK, Wessagowit V, van Rensburg EJ, Chaplin T, Mein CA, 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;127:490-3.

- 
245. Aufenvenne K, Oji V, Walker T, Becker-Pauly C, Hennies HC, Stöcker W, et al. Transglutaminase-1 and bathing suit ichthyosis: molecular analysis of gene/environment interactions. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2068-71.
246. Vahlquist A, Gånemo A, Virtanen M. Congenital ichthyosis: an overview of current and emerging therapies. *Acta Derm Venereol.* 2008;88:4-14.
247. Traupe H, Burgdorf WHC. Treatment of ichthyosis-There is always something you can do! In Memoriam: Wolfgang Küster. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57:542-7.
248. Kempers S, Katz HI, Wildnauer R, Green B. An evaluation of the effect of an alpha hydroxy acid-blend skin cream in the cosmetic improvement of symptoms of moderate to severe xerosis, epidermolytic hyperkeratosis, and ichthyosis. *Cutis.* 1998;61:347-50.
249. Redondo P, Bauzá A. Topical N-acetylcysteine for lamellar ichthyosis. *Lancet.* 1999;354:1880.
250. Gicquel JJ, Vabres P, Dighiero P. [Use of topical cutaneous N-acetylcysteine in the treatment of major bilateral ectropion in an infant with lamellar ichthyosis]. *J Fr Ophtalmol.* 2005;28:412-5.
251. Küster W, Bohnsack K, Rippke F, Upmeyer HJ, Groll S, Traupe H. Efficacy of urea therapy in children with ichthyosis. A multicenter randomized, placebo-controlled, double-blind, semilateral study. *Dermatology.* 1998;196:217-22.
252. Hofmann B, Stege H, Ruzicka T, Lehmann P. Effect of topical tazarotene in the treatment of congenital ichthyoses. *Br J Dermatol.* 1999;141:642-6.
253. Marulli GC, Campione E, Chimenti MS, Terrinoni A, Melino G, Bianchi L. Type I lamellar ichthyosis improved by tazarotene 0.1% gel. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:391-3.
254. Kragballe K, Steijlen PM, Ibsen HH, van de Kerkhof PC, Esmann J, Sorensen LH, et al. Efficacy, tolerability, and safety of calcipotriol ointment in disorders of keratinization. Results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled, right/left comparative study. *Arch Dermatol.* 1995;131:556-60.
255. Shwayder T. Disorders of keratinization: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2004;5:17-29.
256. Beverley DW, Wheeler D. High plasma urea concentrations in collodion babies. *Arch Dis Child.* 1986;61:696-8.
257. Chiaretti A, Schembri Wismayer D, Tortorolo L, Piastra M, Polidori G. Salicylate intoxication using a skin ointment. *Acta Paediatr.* 1997;86:330-1.
258. Ramírez ME, Youseef WF, Romero RG, Martínez JM, González-Enseñat MA, Vilaplana XS, et al. Acute percutaneous lactic acid poisoning in a child. *Pediatr Dermatol.* 2006;23:282-5.
259. Oji V, Traupe H. Ichthyosis: clinical manifestations and practical treatment options. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10:351-64.
260. Gånemo A, Vahlquist A. Lamellar ichthyosis is markedly improved by a novel combination of emollients. *Br J Dermatol.* 1997;137:1017-8.
261. Gånemo A, Virtanen M, Vahlquist A. Improved topical treatment of lamellar ichthyosis: a double-blind study of four
-

- different cream formulations. *Br J Dermatol.* 1999;141:1027-32.
262. Baden HP, Alper JC. A keratolytic gel containing salicylic acid in propylene glycol. *J Invest Dermatol.* 1973;61:330-3.
263. Blanchet-Bardon C, Nazzaro V, Rognin C, Geiger JM, Puissant A. Acitretin in the treatment of severe disorders of keratinization. Results of an open study. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24:982-6.
264. Steijlen PM, Van Dooren-Greebe RJ, Van de Kerkhof PC. Acitretin in the treatment of lamellar ichthyosis. *Br J Dermatol.* 1994;130:211-4.
265. Lacour M, Mehta-Nikhar B, Atherton DJ, Harper JJ. An appraisal of acitretin therapy in children with inherited disorders of keratinization. *Br J Dermatol.* 1996;134:1023-9.
266. Ruiz-Maldonado R, Tamayo-Sanchez L, Orozco-Covarrubias ML. The use of retinoids in the pediatric patient. *Dermatol Clin.* 1998;16:553-69.
267. Katugampola RP, Finlay AY. Oral retinoid therapy for disorders of keratinization: single-centre retrospective 25 years' experience on 23 patients. *Br J Dermatol.* 2006;154:267-76.
268. Brecher AR, Orlow SJ. Oral retinoid therapy for dermatologic conditions in children and adolescents. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:171-82; quiz 83-6.
269. Ormerod AD, Campalani E, Goodfield MJ, Unit BCS. British Association of Dermatologists guidelines on the efficacy and use of acitretin in dermatology. *Br J Dermatol.* 2010;162:952-63.
270. Lucker GP, Heremans AM, Boegheim PJ, van de Kerkhof PC, Steijlen PM. Oral treatment of ichthyosis by the cytochrome P-450 inhibitor liarozole. *Br J Dermatol.* 1997;136:71-5.
271. Verfaillie CJ, Vanhoutte FP, Blanchet-Bardon C, van Steensel MA, Steijlen PM. Oral liarozole vs. acitretin in the treatment of ichthyosis: a phase II/III multicentre, double-blind, randomized, active-controlled study. *Br J Dermatol.* 2007;156:965-73.
272. van Steensel MA. Emerging drugs for ichthyosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2007;12:647-56.
273. Haenssle HA, Finkenrath A, Hausser I, Oji V, Traupe H, Hennies HC, et al. Effective treatment of severe thermodysregulation by oral retinoids in a patient with recessive congenital lamellar ichthyosis. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33:578-81.
274. Golbus MS, Sagebiel RW, Filly RA, Gindhart TD, Hall JG. Prenatal diagnosis of congenital bullous ichthyosiform erythroderma (epidermolytic hyperkeratosis) by fetal skin biopsy. *N Engl J Med.* 1980;302:93-5.
275. Rodeck CH, Eady RA, Gosden CM. Prenatal diagnosis of epidermolysis bullosa letalis. *Lancet.* 1980;1:949-52.
276. Holbrook KA, Smith LT, Elias S. Prenatal diagnosis of genetic skin disease using fetal skin biopsy samples. *Arch Dermatol.* 1993;129:1437-54.
277. Shimizu A, Akiyama M, Ishiko A, Yoshiike T, Suzumori K, Shimizu H. Prenatal exclusion of harlequin ichthyosis; potential pitfalls in the timing of the fetal skin biopsy. *Br J Dermatol.* 2005;153:811-4.
278. Schorderet DE, Huber M, Laurini RN, Von Moos G, Gianadda B, Délèze G, et al. Prenatal diagnosis of lamellar ichthyosis by direct

- mutational analysis of the keratinocyte transglutaminase gene. *Prenat Diagn.* 1997;17:483-6.
279. Bichakjian CK, Nair RP, Wu WW, Goldberg S, Elder JT. Prenatal exclusion of lamellar ichthyosis based on identification of two new mutations in the transglutaminase 1 gene. *J Invest Dermatol.* 1998;110:179-82.
280. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Nakamura H, Takizawa Y, Sawamura D, Matsunaga K, et al. DNA-based prenatal exclusion of bullous congenital ichthyosiform erythroderma at the early stage, 10 to 11 weeks' of pregnancy, in two consequent siblings. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:1008-11.
281. Luu M, Cantatore-Francis JL, Glick SA. Prenatal diagnosis of genodermatoses: current scope and future capabilities. *Int J Dermatol.* 2010;49:353-61.
282. Burton BK, Schulz CJ, Angle B, Burd LI. An increased incidence of haemangiomas in infants born following chorionic villus sampling (CVS). *Prenat Diagn.* 1995;15:209-14.
283. Wells D, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med.* 2001;7:23-30.
284. Uitto J, Pfenner E, Jackson LG. Probing the fetal genome: progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Trends Mol Med.* 2003;9:339-43.
285. Bongain A, Benoit B, Ejnes L, Lambert JC, Gillet JY. Harlequin fetus: three-dimensional sonographic findings and new diagnostic approach. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;20:82-5.
286. Holden S, Ahuja S, Ogilvy-Stuart A, Firth HV, Lees C. Prenatal diagnosis of Harlequin ichthyosis presenting as distal arthrogyposis using three-dimensional ultrasound. *Prenat Diagn.* 2007;27:566-7.
287. Milstone LM, Rizzo WB, Pickford JR. Meeting report from Frontiers in Ichthyosis Research. *J Invest Dermatol.* 2011;131:279-82.
288. Hengge UR. Gene therapy progress and prospects: the skin--easily accessible, but still far away. *Gene Ther.* 2006;13:1555-63.
289. Choate KA, Kinsella TM, Williams ML, Nolan GP, Khavari PA. Transglutaminase 1 delivery to lamellar ichthyosis keratinocytes. *Hum Gene Ther.* 1996;7:2247-53.
290. Choate KA, Medalie DA, Morgan JR, Khavari PA. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med.* 1996;2:1263-7.
291. Hengge UR, Bardenheuer W. Gene therapy and the skin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;131C:93-100.
292. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, et al. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: an implication for gene therapy. *J Invest Dermatol.* 2003;120:610-5.
293. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet.* 2006;43:295-305.
294. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science.* 1974;185:862-4.

295. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol.* 2004;11:377-94.
296. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67.
297. Fairbrother WG, Yeo GW, Yeh R, Goldstein P, Mawson M, Sharp PA, et al. RESCUE-ESE identifies candidate exonic splicing enhancers in vertebrate exons. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W187-90.
298. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3568-71.
299. Flicek P, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, et al. Ensembl 2008. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:D707-14.
300. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18:2714-23.
301. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21:263-5.
302. Salas A, Quintáns B, Alvarez-Iglesias V. SNaPshot typing of mitochondrial DNA coding region variants. *Methods Mol Biol.* 2005;297:197-208.
303. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;68:978-89.
304. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1162-9.
305. Bergman A, Einbeigi Z, Olofsson U, Taib Z, Wallgren A, Karlsson P, et al. The western Swedish BRCA1 founder mutation 3171ins5; a 3.7 cM conserved haplotype of today is a reminiscence of a 1500-year-old mutation. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:787-93.
306. Risch N, de Leon D, Ozelius L, Kramer P, Almasy L, Singer B, et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet.* 1995;9:152-9.
307. Reeve JP, Rannala B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics.* 2002;18:894-5.
308. Sham PC, Zhao JH, Curtis D. The effect of marker characteristics on the power to detect linkage disequilibrium due to single or multiple ancestral mutations. *Ann Hum Genet.* 2000;64:161-9.
309. Labuda D, Zietkiewicz E, Labuda M. The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim. *Am J Hum Genet.* 1997;61:768-71.
310. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15:7-12.
311. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet.* 2002;31:241-7.

- 
312. DD K. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics*. 1944;12:172-5.
313. Vázquez-Varela J. *Nova historia de Galicia*. A Coruña: Tambre, 1996.
314. Tremblay M, Vézina H. New estimates of intergenerational time intervals for the calculation of age and origins of mutations. *Am J Hum Genet*. 2000;66:651-8.
315. Mizrachi-Koren M, Shemer S, Morgan M, Indelman M, Khamaysi Z, Petronius D, et al. Homozygosity mapping as a screening tool for the molecular diagnosis of hereditary skin diseases in consanguineous populations. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:393-401.
316. Kim SY, Kim IG, Chung SI, Steinert PM. The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J Biol Chem*. 1994;269:27979-86.
317. Lai TS, Achyuthan KE, Santiago MA, Greenberg GS. Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity. *J Biol Chem*. 1994;269:24596-601.
318. Esposito G, Tadini G, Paparo F, Viola A, Ieno L, Pennacchia W, et al. Transglutaminase 1 deficiency and corneocyte collapse: an indication for targeted molecular screening in autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br J Dermatol*. 2007;157:808-10.
319. Salas A, Comas D, Lareu MV, Bertranpetit J, Carracedo A. mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet*. 1998;6:365-75.
320. Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B, Bond PM, Janin N, Douglas FS, et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat*. 2001;17:520-1.
321. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, Barreiro J, Lestón DG, Cabezas-Agrícola JM, et al. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64:330-6.
-



## 9. ANEXOS



## ANEXO I

### I.1. PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *TGM1*

Exón	Primer	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1	TGM1-1F	ACTTGGGCTGCAACAGAACTCGG	23	406
	TGM1-1R	GCACGGCCTCTGATAGTGTGG	21	
2	TGM1-2F	ACTGGCTGGACTACCTGGTTA	21	430
	TGM1-2R	AGTCTCTGGTCCCATTAAGC	20	
3	TGM1-3F	AATGATAAGGGCCTGGGCACC	21	302
	TGM1-3R	GCCTCTCCCCACCAAACATAG	21	
4	TGM1-4F	GTCCCAGGCTCCATCCCCTCTCCT	24	361
	TGM1-4R	TCCCTGTCTTTCCCTCCCATCT	22	
5-6	TGM1-5F	AACTGGCCAGAAGTAGGTGAG	21	558
	TGM1-6R	AGTATCCTTTACAGGGCAGGG	21	
7	TGM1-7F	TTTAGGGGTAAGGGGTGGTTG	21	328
	TGM1-7R	CTGTAGGGCCCCGGGCCACCCT	21	
8-9	TGM1-8F	ATACTCCTGACACGATGCCTC	21	525
	TGM1-9R	GGACTGTGTTAATCAGGTGGG	21	
10	TGM1-10F	TCGCATCCCTCTCCGCCTTCTC	22	197
	TGM1-10R	CCATGACTGAAGCCCAAGAAGGC	23	
11	TGM1-11F2	TGGCTCGTCTTGGAAGTCT	20	650
	TGM1-11R2	CTCTACTGCCTTCCGCTCTG	20	
12	TGM1-12F	AGTGTTCCCTGCCAAGTGGTTG	21	415
	TGM1-12R	TCCATGTCCACAGCCCTGAG	20	
13	TGM1-13F	GGGAAGCCTCATGTAGGGAAG	21	274
	TGM1-13R	GTCCTTATCCGGCCTTCACTC	21	
14	TGM1-14F	TACGGTCCCCGTGTGTTTGG	20	247
	TGM1-14R	TGGGAAGGCCAGAGTGGAAG	20	
15	TGM1-15F	AGCTCTTACTCCCCACTCCAC	21	422
	TGM1-15R	ACTGACTCCCTCTCCGGGAG	20	

## I.2. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ALOXE3

Exón	Primer	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1A	ALOXE3 1AF	ACCATTGACATGTGCTGGA	20	506
	ALOXE3 1AR	CTGGGTAGGGCTGAGGATG	19	
1B	ALOXE3 1BF	GTGTCAGAGGCAAGCAAACA	20	537
	ALOXE3 1BR	TAGGGAAGGTGAGGAGGTCA	20	
2	ALOXE3 2F	CATACAAAAGCCCCGGTATGG	20	590
	ALOXE3 2R	AGAGAAGGGTGCCTGCCTAT	20	
3	ALOXE3 3F	TAATTTGGGGGTGAAGCTGT	20	596
	ALOXE3 3R	AAATCATGGCCGGTTAGTG	20	
4	ALOXE3 4F	ACCCTATGTGAAGCCAGTGC	20	422
	ALOXE3 4R	ATCTCCCATCCTGATGCTTG	20	
5	ALOXE3 5F	AGGAGCCGGGAGTAAGAGAG	20	334
	ALOXE3 5R	GAATAGGGAGAAGGGGCAGT	20	
6	ALOXE3 6F	TCCCATGTGGATTGTTAGGC	20	360
	ALOXE3 6R	TCCCACTCAAATCCAGCAGT	20	
7	ALOXE3 7F	TCAGCTGTGCAAGTCACTCC	20	495
	ALOXE3 7R	GCTGCCAGAGGATGAGG	18	
8	ALOXE3 8F	GTACCCCACTTTGGCCATTA	20	449
	ALOXE3 8R	CAGTCCCATTTCGGAGTCAGT	20	
9-10	ALOXE3 9F	CTTGCCATCCAGGTGAG	18	629
	ALOXE3 10R	CTGGTGAAGAGGCAGTGAT	20	
11	ALOXE3 11F	ATTTGATCCGTGGATTGCTT	20	451
	ALOXE3 11R	AGGGACCCCAAACCTCAATTC	20	
12	ALOXE3 12F	CCTGTGCAGGAAGGAAGTGT	20	537
	ALOXE3 12R	AATGGCTTTGGAGACAGTCG	20	
13	ALOXE3 13F	TGAAGCTGCCTCTGTCATTG	20	482
	ALOXE3 13R	CCACTCCAACCCCAAGTCTA	20	
14	ALOXE3 14F	TCCACTCCCTACCCTTTCCT	20	484
	ALOXE3 14R	CAAGGCAGTTCTGCAGTGAA	20	
15	ALOXE3 15F	TTTACAATGGCTGCAACTGG	20	536
	ALOXE3 15R	ACTTTGGTCAGCGGCTTTTA	20	

## I.3. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ALOX12B

Exón	Primer	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1	ALOX12B 1F	CTTCATCCACGGCATCTTCT	20	673
	ALOX12B 1R	CTGTGCCTCAGCTCTCCAG	19	
2	ALOX12B 2F	AGTCCAGGGAGGTGAGCATT	20	480
	ALOX12B 2R	GAGGGAAATGTGTGACAGTGG	21	
3-4	ALOX12B 3F	ACAGGACGCACCTTCACTCT	20	583
	ALOX12B 4R	CCGGAATATAGCCATTCCAC	20	
5	ALOX12B 5F	CTGGCGAGTCTTCTTCCTG	20	550
	ALOX12B 5R	TCTCTGGGTCTCAGGGTCTG	20	
6	ALOX12B 6F	CCCAGAGACCTAGAGATGCAA	21	493
	ALOX12B 6R	GAAGACTATGGGCACCGAGA	20	
7	ALOX12B 7F	GCGGCTTCTTGAAAAATGT	19	590
	ALOX12B 7R	GGTAAATGTTCCCTTCTGGA	21	
8	ALOX12B 8F	ACAAGTTCCCCGTCACAGAC	20	551
	ALOX12B 8R	GCTGAATACATGCAGGTCCA	20	
9	ALOX12B 9F	TTGAGCAGAAGGAACAGCAA	20	584
	ALOX12B 9R	AGCTCCCCATTCTGTAACG	20	
10	ALOX12B 10F	CAAGAGAGGGCTTGGCATAG	20	376
	ALOX12B 10R	CCTGCCTCTGCTCCTTCTA	20	
11	ALOX12B 11F	GAGCAGGATTGTTCTGGAG	20	464
	ALOX12B 11R	TGAGGGTGTAGGTGTGATGG	20	
12	ALOX12B 12F	CTTCTGCCCCACAGGACTT	19	400
	ALOX12B 12R	CAGCAATTGGTCTCCTTCA	20	
13	ALOX12B 13F	AGGATGAGGGTACGGATGC	19	373
	ALOX12B 13R	GTTGGGACTGGAGTTGAAGC	20	
14	ALOX12B 14F	CACCCCCAGTCTAACCAACC	20	548
	ALOX12B 14R	AAGTGAATGTCCGGGAAGTG	20	
15	ALOX12B 15F	AGGATAACTAGCGCGTCAA	20	498
	ALOX12B 15R	CCAGCGCCCCAGTAACTT	18	

I.4. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *NIPAL4*

Exón	Primer	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1	NIPAL4 1F	ATTGGCAGCAGTACCCACTT	20	687
	NIPAL4 1R	AGTCTCAGCCAGAACCCAGA	20	
2	NIPAL4 2F	GGAGGCACGGTATATGGGTA	20	499
	NIPAL4 2R	TGGGATTCCAGATAGGGTTG	20	
3	NIPAL4 3F	CAGAACCAAGCCTCAAGGAG	20	392
	NIPAL4 3R	GTGCAAACCTCTCTGGGAGT	20	
4	NIPAL4 4F	GGGAGAGAGCGTATGGATCA	20	399
	NIPAL4 4R	GCAAACATTCCCAGGGTCTA	20	
5	NIPAL4 5F	TTCTGATCTGTTGTTCTCTGTGA	23	397
	NIPAL4 5R	TCTTCTTTAGCTTGCCTTCTCC	22	
6A	NIPAL4 6AF	AGTCATGAAGCTGGGACTGG	20	581
	NIPAL4 6AR	ATGAACACGCCCAAGATGAT	20	
6B	NIPAL4 6BF	CCTCAACAGAGCACTGGACA	20	488
	NIPAL4 6BR	TCAAGAAAAGAGAGCCCATTG	21	

I.5. PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *CYP4F22*

Exón	Primer	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1	CYP4F22 1F	GTGTGCTGGGAACCTTCTGT	20	506
	CYP4F22 1R	AAACTGCTTGCCCTCTCTGA	20	
2	CYP4F22 2F	AGCCAAGTGCCTGAAATCAT	20	537
	CYP4F22 2R	GCCACATCTTTGCCATACT	20	
3	CYP4F22 3F	GCAGAGGCAGGAAAAGTGC	19	590
	CYP4F22 3R	TAATGTCAGCGCTCTGGTTG	20	
4-5	CYP4F22 4F	CCCCAAGGATGACCTCTTCT	20	596
	CYP4F22 5R	AGCTCCCATAGGCCAGAGTT	20	
6	CYP4F22 6F	TCTATTCAATGGGGACAGGAG	21	422
	CYP4F22 6R	CACCACGCCTAATGGAGTTT	20	
7-8	CYP4F22 7F	ACAGTCGGAGGCTGCAGTTA	20	334
	CYP4F22 8R	TGCATTATGAGGTGGGCATA	20	
9	CYP4F22 9F	TGTGCATGAGACAACTGCAA	20	360
	CYP4F22 9R	TGCACACACAACTGGGTTTT	20	
10	CYP4F22 10F	AGGATGGACAGAAGGTGGTG	20	495
	CYP4F22 10R	AAATGGCTAAATGCGGAGTG	20	
11	CYP4F22 11F	AGTGCAAGGTGGAATGGAAG	20	449
	CYP4F22 11R	GGTGCTCAATACCCAGGATG	20	
12	CYP4F22 12F	CAGACACTCAACCCCAAGGT	20	629
	CYP4F22 12R	GTACCACCAGGCTGCTCAAC	20	

## I.6. PRIMERS PARA EL ESTUDIO DE SNPs

## I.6.1. PRIMERS DEL MULTIPLEX 1

SNP	Primers	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
rs6573653	rs6573653F	TGACCAAGGGCTGCTGAGTGAAAAT	25	189
	rs6573653R	TGCGGAGTGGACTTCCTCAAGTCAG	25	
rs2281473	rs2281473F	ACAGACAGTGCTGCGAGTGGGGTAA	25	237
	rs2281473R	TTCCTGAGAAGTTGTCCAGGCTCCA	25	
rs2180196	rs2180196F	AACCTGAGCCCAAGCCCTATTCTG	25	270
	rs2180196R	GCCCTCTCAGGCTACCAAGCTGTTG	25	
rs7151201	rs7151201F	CCCACCTCGGGTTGTTTCCTAGAG	25	330
	rs7151201R	CAGCCCAGGCACTGTGATAGTCAGG	25	
rs941504	rs941504F	TGGTGCTTGGAGCTGGACAAGAAAA	25	353
	rs941504R	CGTCACTGGGGAACACTGAGGATG	25	
rs2748525	rs2748525F	AGGACAGGACGCCCCATCCTTTATC	25	381
	rs2748525R	CATTCTCCCTGCACCACCTGTCTTG	25	
rs1950494	rs1950494F	CACCAGGAGAGCTGCTGTGTGTGAG	25	450
	rs1950494R	CTCTGCTCTTCCCACTGTGGTGCAT	25	
rs7158744	rs7158744F	CCCATGAGCCCTTTGTCTTGAAAGC	25	539
	rs7158744R	TGCACATGGCCTTCCTGTATCATCC	25	
rs14193	rs14193F	GGTGGAAGGCACGCAGTTACCTGTT	25	592
	rs14193R	CCACCTCCATTCTGCCAAACTCAT	25	
rs3742506	rs3742506F	GGTGAGCAGGAATGAGTGAGCCAGA	25	625
	rs3742506R	TGTGTGGACCTTACCCAGGGTCTGA	25	
rs17256811	rs17256811F	GCTCAGCAAGTCCACACCGTTCACT	25	676
	rs17256811R	GAATGGTCTTCGCGGAAGGTCTCTG	25	

## I.6.2. PRIMERS DEL MULTIPLEX 2

SNPs	Primers	Secuencia	Longitud del primer (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
rs2229463	rs2229463F	TCCTGGGGAGCTGCTCTGTAGTGTG	25	321
	rs2229463R	CACAGGGACATTGGAGGCAATGAAA	25	
rs3814813/ rs3814814 rs2273301/ rs2273302	rs3814813F	GTGGGGGACGTGAAATGAGATTGCT	25	875
	rs3814813R	AGCCTAGCTGGGGCTGACAGGTACA	25	
rs1126432	rs1126432F	GCTAGTCTCTTGGGGTGTGGCATCC	25	991
	rs1126432R	CTCCGCCCTATCTCATCCTGTCCTG	25	
rs2229464/ rs2273303/ rs7147300/ rs8193032/ rs2855009	rs2229464F	AGGAGCCTCCCAGACCAGCTTCTTC	25	1105
	rs2229464R	TTCACTCTCTGACCACCCCTCATGC	25	

## I.7. SONDAS PARA EL ESTUDIO DE SNPs

## I.7.1. SONDAS DEL MULTIPLEX 1

SNP	Secuencia de la sonda <sup>1</sup>	Longitud de la sonda (pb)
RS2281473 F	ACAAAGACTGGTCCCC [C/T]	16
RS3742506 F2	cagtcagtcagtCAGCGGTGAAGTTGG [A/G]	27
RS7158744 F3	cagtcagtcagtCAGGACCAGAATATCAGGTA [C/T]	32
RS7151201 F	cagtcagtcagtcagtcagtcagtCCCACATGTTAGGGC [C/A]	39
RS6573653 R	cagtcagtcagtcagtcagtcagtGTTTTTTGAAAATCAGGAA [C/G]	43
RS941504 F2	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtTTCCTTGTGTCTTCTTGTC [A/G]	47
RS2748525 R2	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtACTTACCACTCTGTCCCTCTC [C/T]	52
RS1950494 F	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtCCATTGTTCTTTCTCAGGA [A/G]	55
RS14193 R2	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtTGACTTGTCACACAATCG [C/T]	58
RS17256811 F	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtCCAGTTGACCCAGAAA [C/T]	64
RS2180196 R	cagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtCCAGCTCCTTCTTTCTG [C/T]	69

<sup>1</sup>En letras minúsculas se señala la cola no específica del *primer* y entre paréntesis el cambio de bases.



## I.8. PRIMERS PARA EL ESTUDIO DE MICROSATÉLITES

Microsatélite	Primer	Secuencia	Marcado con	Acceso en GenBank	Tamaño del fragmento amplificado (pb) <sup>1</sup>
D14S64	D14S64F	AGCCTGGGCAACACAGTGAGA	Fam	Z16540.1	137
	D14S64R	CATGGGATAGAAGCAACACAGATGA			137
D14S1032	D14S1032F	CCTGGGTGAAGAAATAATCTGTACAACA	Hex	Z53884.1	162
	D14S1032R	CCATGTTGCCACAAATAACAGGATT			162
D14S581	D14S581F	TGAGGCCCTAAGAAACCATTACAT	Fam	G09040.1	181
	D14S581R	CCTCCTGTGCTTACTCCTCACATTC			181
D14S275	D14S275F	AAGCATTCCCTATTCTGGACACCAA	Hex	Z24107.1	193
	D14S275R	AGTATCAGGTTCTTGGGTACTCAATCTCT			193
D14S1060	D14S1060	TGACATGTAAAAATGGGCCACAATA	Fam	Z51690.1	213
	D14S1060	AAAGAAGTGTATGTATCAGACCAACCCTA			213
D14S264	D14S264F	AGCCCCAAATATCACTCCAAATAGA	Hex	Z23348.1	227
	D14S264R	AGAGTTGGCAACCACTTCTGTTCTTG			227
D14S72	D14S72F	TGGAGACTTACAGGAATAATGATCAAGC	Fam	Z16878.1	264
	D14S72R	GGCTATCTCAGACACTTGAATCTATG			264
D14S1042	D14S1042F	CAAAGAAAGGTAAATTACTTGTGCATAACC	Hex	Z50925.1	281
	D14S1042R	CAATTACAGGCACCTGCCATCA			281
D14S1043	D14S1043F	TCAGGGGCTTGAATTATCACATAG	Fam	Z51382.1	367
	D14S1043R	TCTGATACTCTGGAGCATAGGTATGTGTG			367
D14S742	D14S742F	TAGGGCGTGGTTTTCTTCATAACC	Hex	G10057.1	399
	D14S742R	TGCCCTTAACATCAGTGCTTCTAA			399

<sup>1</sup>De acuerdo con la secuencia de acceso en GenBank.

## ANEXO II. PUBLICACIONES

### II.1. LAMELLAR ICHTHYOSIS WITH A NOVEL HOMOZYGOUS C- TERMINAL MUTATION IN THE *TRANSGLUTAMINASE-1* GENE

Laura Rodríguez-Pazos, Manuel Ginarte, Ana Vega-Gliemmo, Jaime Toribio.

Int J Dermatol 2009;48:1195-7.

Medical genetics: Report

## Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the *transglutaminase-1* gene

Laura Rodríguez-Pazos, MD, Manuel Ginarte, MD, PhD, Ana Vega-Gliemmo\*, PhD, and Jaime Toribio, MD, PhD

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario, Santiago de Compostela, Spain

### Correspondence

Dra. Laura Rodríguez Pazos  
Departamento de Dermatología  
Facultad de Medicina  
C/ San Francisco s/n  
15782 Santiago de Compostela, Spain  
E-mail: ladrizos@hotmail.com

\*Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica-SERGAS, Grupo de Medicina Genómica-USC, CIBERER, Santiago de Compostela, Spain.

### Introduction

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a rare, heterogeneous keratinization disorder of the skin, classically divided into two clinical subtypes, lamellar ichthyosis (LI) and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma (CIE).

In majority of patients, LI is caused by transglutaminase-1 (TGase1) deficiency resulting from mutations in both copies of the *Transglutaminase 1* (*TGM1*) gene in chromosome 14.<sup>1</sup> This enzyme catalyzes the formation of the cornified cell envelope in the upper layers of the epidermis by cross-linking numerous structural proteins, such as involucrin and loricrin. In the last years, genetic heterogeneity of both LI and CIE has been demonstrated.<sup>2-4</sup> To date, mutations have been localized on chromosomes 2, 3, 19, and 17 (gene *ABCA12*) in LI;<sup>2</sup> on chromosome 17 (genes *ALOX3* and *ALOX12B*)<sup>3</sup> in both LI and CIE, and even in some cases of self-healing collodion baby, and on chromosome 5 (ichthyin gene) in CIE.<sup>4</sup> However, mutations on *TGM1* gene are still responsible for the majority of cases of LI.

### Case report

A 4-month-old caucasian male subject who was the second child of apparently nonconsanguineous parents was pre-

### Abstract

**Background** The majority of cases of Lamellar ichthyosis (LI) are caused by mutations in the transglutaminase-1 (*TGM1*) gene. The mutations in the  $\beta$ -barrel domains of the *TGM1* gene are found very infrequently and several authors have suggested that these domains are not essential for the function of the enzyme. Other authors have postulated that mutations in these loci are pathogenic but they imply a less severe clinical picture of LI.

**Case report** We report a patient with a severe phenotype of LI who had a homozygous mutation affecting the  $\beta$ -barrel 2 domain of the *TGM1*.

**Conclusions** This finding indicates that the integrity of  $\beta$ -barrel domains is important for the correct function of the enzyme and that we are still far away from a consistent genotype-phenotype correlation.

sented in our Dermatology Service. He had been born as a collodion baby without other congenital anomalies. There was no family history of congenital ichthyosis. Physical examination revealed his entire body covered with large, white, plate-like scales, with no erythroderma. Palms and soles were intensively affected as well as flexures. Ectropion and eclabium were present as a result of tightness of facial skin. Peripheral alopecia was seen on the scalp (Fig. 1).

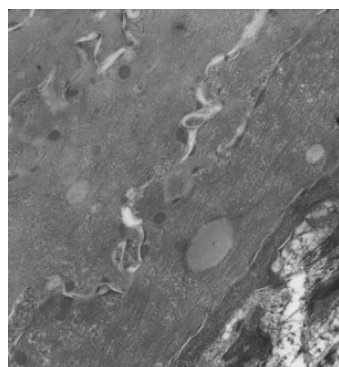
After getting informed consent from the parents, skin biopsies were obtained at this age from the inner aspect of the thigh. Light microscopy showed a thick orthokeratotic stratum corneum and a normal granular layer with mild acanthosis. Electron microscopy showed lipid droplets in the horny layer. Moreover, the cornified envelopes were lost and abnormal electron-dense aggregates were seen along the cell periphery and in the cytoplasm of the corneocytes (Fig. 2). There were no crystalloids or membranous structures.

The *TGM1* gene was analyzed in the patient after getting the approval of the Ethical Committee of our Institution. For this, DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. The entire coding regions and exon-intron boundaries of the *TGM1* gene were studied by direct DNA sequencing after amplification by polymerase chain reaction. A homozygous mutation was identified in exon 15. This mutation was a change of cytosine to thymine at

1195



**Figure 1** Severe facial involvement showing white scales without erythema, ectropion, eclabium and mild alopecia of the eyebrows and the scalp



**Figure 2** Electron microscopy of the skin of the patient showing lipid droplets in the horny layer, loss of the cornified envelopes and electron-dense aggregates along the cell periphery and in the cytoplasm of the corneocytes

nucleotide position 2278: c.2278 C > T. This mutation affects codon 760 (according to GenBank NM000359) located in the  $\beta$ -barrel 2 domain, and determines the change from arginine to a premature stop codon (p.R760X). The analysis of exon 15 in the samples of the

parents revealed that they were both heterozygous carriers of p.R760X. The p.R760X base substitution was not found in 116 chromosomes from healthy individuals (Fig. 3).

### Discussion

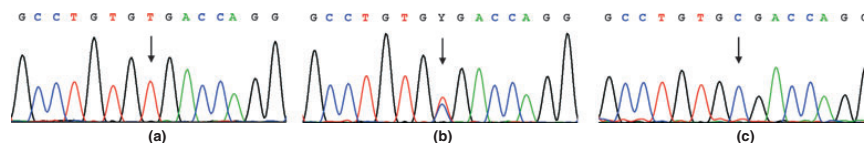
Lamellar ichthyosis and CIE can be distinguished by clinical, histopathologic, ultrastructural, and molecular findings. Patients with LI have big, dark, plate-like scales with no severe erythroderma, while those with CIE show variable erythroderma and generalized fine scaling.<sup>5,6</sup> Although histologic findings are not diagnostic, LI is associated with a greater hyperkeratosis, while parakeratosis is more evident in patients with CIE.<sup>5,6</sup>

Electron microscopy classifies ARCI into four types. The most common markers of type I ichthyosis include lipid droplets and lamellar structures. This type is found in patients with erythroderma and fine scaling.<sup>7</sup> Type II is ultrastructurally defined by the presence of crystalloid structures, called cholesterol clefts, in the thickened corneal layer. These structures are found in almost every patient with LI.<sup>8</sup> Types III and IV are much less frequent, and are characterized by elongated membrane structures, abnormal keratinosomes, and vesicular complexes, and by packages of trilaminar membrane structures, respectively.

Interestingly, in our patient, electron microscopy showed lipid droplets in the cornified cells which are suggestive of ichthyosis congenital type I, instead of the crystalloid structures found in most patients with LI which correspond with type II. In addition to these ultrastructures, the loss of the cornified envelopes and the presence of electron-dense aggregates on the corneocytes of the patient are suggestive of TGase1 deficiency as reported in *TGM1* knockout mice.<sup>9</sup> A similar electron micrograph has been found in a human case of LI.<sup>10</sup>

In LI, the majority of *TGM1* mutations reported have been identified in the central core domain or upstream of the gene and, moreover, the region of arginines in codons 141 and 142 is thought to be more susceptible to mutations.<sup>11</sup> In contrast, mutations in the  $\beta$ -barrel domains have been rarely found. Several authors suggest that  $\beta$ -barrel domains, at the carboxyl-terminus of the gene, increase TGase1 activity but are not essential for the function of the enzyme.<sup>12,13</sup>

To date, only five mutations in  $\beta$ -barrel domains, including p.R760X, have been reported in patients with ARCI,<sup>14-17</sup> all of them being compound heterozygotes, with the other mutation affecting the core domain. Furthermore, four of these patients showed a CIE or a mild LI phenotype; therefore, it has been speculated that loss of a part of the C-terminal domains of the TGase1 protein could lead to a less severe clinical picture than other mutations in the same gene.<sup>17</sup>



**Figure 3** DNA sequencing patterns around the mutation of c.2278 C > T in the TGM1 gene. (a) Proband sample reveals homozygous C > T transition at nucleotide position 2278, that leads to nonsense mutation p.R760X. (b) Heterozygous mutation was found in parent samples. (c) Wild-type sequence of a healthy control DNA

Nevertheless, our results do not support this idea as our patient suffers from a severe LI phenotype and presents both alleles affected in the  $\beta$ -barrel 2. This indicates that unfortunately, we are still far away from a consistent genotype-phenotype correlation.

#### Conclusion

In summary, our data suggest that mutations in the  $\beta$ -barrel domains (or at least  $\beta$ -barrel 2 domain) of the TGM1 gene are also associated with severe LI phenotypes. Moreover, this finding firmly supports the importance of the integrity of  $\beta$ -barrel domains for the correct function of the TGase1 enzyme.

#### References

- Huber M, Rettler I, Bernasconi K, et al. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995; 267: 474-475.
- Lefèvre C, Audebert S, Jobard F, et al. Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2369-2378.
- Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, et al. Lipoxigenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxigenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 107-113.
- Lefèvre C, Bouadjar B, Karaduman A, 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: 2473-2482.
- Hazell m, Marks R. Clinical, histologic, and cell kinetic discriminants between lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol* 1985; 121: 489-493.
- Peña Penabad C, García Silva J, Unamuno Pérez P. Estudio clínico e histopatológico de 17 casos de ictiosis laminar. *Actas Dermosifiliogr* 1996; 87: 381-389.
- Niemi K-M, Kanerva L, Kuokkanen K. Recessive ichthyosiscongenita type II. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 211-218.
- Niemi K-M, Kanerva L, Kuokkanen K, Ignatius J. Clinical, light and electron-microscopic features of recessive congenital ichthyosis type I. *Br J Dermatol* 1994; 130: 626-633.
- Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, et al. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1044-1049.
- Yotsumoto S, Akiyama M, Yoneda K, et al. Analyses of the transglutaminase 1 gene mutation and ultrastructural characteristics in a Japanese patient with lamellar ichthyosis. *J Dermatol Sci* 2000; 24: 119-125.
- Laiho E, Ignatius J, Mikkola H, et al. Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 529-538.
- Kim SY, Kim IG, Chung SI, Steinert PM. The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J Biol Chem* 1994; 269: 27979-27986.
- Lai TS, Achyuthan KE, Santiago MA, Greenberg GS. Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 24596-24601.
- Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, Shimizu H. Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* 2001; 144: 401-407.
- Huber M, Yee VC, Burri N, et al. Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase. *J Biol Chem* 1997; 272: 21018-21026.
- Shevchenko YO, Compton JG, Toro JR, et al. Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies. *Hum Genet* 2000; 106: 492-499.
- Becker K, Csikós M, Sárdy M, 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: 324-329.

## II.2. CHARACTERIZATION OF *TGM1* C.984+1G>A MUTATION IDENTIFIED IN A HOMOZYGOUS CARRIER OF LAMELLAR ICHTHYOSIS

Laura Fachal, Laura Rodríguez-Pazos, Manuel Ginarte, Andrés Beiras, José Manuel Suárez-Peñaranda, Jaime Toribio, Ángel Carracedo, Ana Vega.

Aceptado para su publicación en el International Journal of Dermatology.

**De:** onbehalfof+malley.melissa+mayo.edu@manuscriptcentral.com  
[mailto:onbehalfof+malley.melissa+mayo.edu@manuscriptcentral.com] **En nombre de** malley.melissa@mayo.edu  
**Enviado el:** lunes, 21 de marzo de 2011 21:16  
**Para:** ana.vega@usc.es  
**Asunto:** International Journal of Dermatology

21-Mar-2011

DD-2010-1537.R1 - Characterization of *TGM1* c.984+1G>A mutation identified in a homozygous carrier of Lamellar Ichthyosis

Dear Dr. Vega:

The Editor has provided an acceptance decision at this time for the article referenced above; however, a figure legends page was not included with your submission and that is needed for me to continue processing. Please provide a figure legends page in Word format that you can send to me as an e-mail attachment.

Please feel free to contact me if you have any questions regarding this request. Otherwise, I look forward to hearing from you at your earliest convenience.

Sincerely,  
Ms. Melissa Malley  
International Journal of Dermatology

International Journal of Dermatology



**Characterization of TGM1 c.984+1G>A mutation identified in a homozygous carrier of Lamellar Ichthyosis**

Journal:	<i>International Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	IJD-2010-1537.R1
Manuscript Type:	Medical Genetics
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fachal, Laura; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER, RODRIGUEZ PAZOS, LAURA; Complejo Hospitalario Universitario, Facultad de Medicina, Department of Dermatology GINARTE, MANUEL; Complejo Hospitalario Universitario, Facultad de Medicina, Department of Dermatology Toribio, Jaime; Complejo Hospitalario Universitario, Facultad de Medicina, Department of Dermatology Beiras, Andrés; Complejo Hospitalario Universitario, Facultad de Medicina, Department of Pathology SUAREZ PENARANDA, JOSE; Hospital Clínico Universitario, Pathology Carracedo, Ángel; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER, Vega, Ana; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER,
Keywords:	molecular genetics of inherited skin, ichthyosis

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Characterization of *TGM1* c.984+1G>A mutation identified in a homozygous carrier of Lamellar Ichthyosis

Laura Fachal<sup>1\*</sup>, Laura Rodríguez-Pazos<sup>2\*</sup>, Manuel Ginarte<sup>2</sup>, Andrés Beiras<sup>3</sup>, José Manuel Suárez-Peñaranda<sup>3</sup> Jaime Toribio<sup>2</sup>, Ángel Carracedo<sup>1</sup>, Ana Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER, IDIS, Santiago de Compostela, Spain.

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario, Santiago de Compostela, Spain

<sup>3</sup>Department of Pathology, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, SERGAS, IDIS, Santiago de Compostela, Spain.

\* These authors contributed equally to this work

Case Report, 3 Figures

Key words: Lamellar Ichthyosis, *TGM1* gene, splicing

Corresponding author: Ana Vega. Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Choupana s/n, 15706, Santiago de Compostela, Galicia, Spain. Phone: +34-981951491. Fax: +34-981951473. E-mail address: [ana.vega@usc.es](mailto:ana.vega@usc.es)

1  
2  
3 Abstract  
4  
5

6 **Background** Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a rare, nonsyndromic,  
7 heterogeneous disorder of the cornification, defined into three clinical subtypes which  
8 includes the spectrum of lamellar ichthyosis (LI) and congenital ichthyosiform  
9 erythroderma, as so as harlequin ichthyosis. In the majority of patients, LI is caused by  
10 transglutaminase-1 (TGase1) deficiency resulting from mutations in both copies of the  
11 Transglutaminase 1 (*TGM1*) gene in chromosome 14.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

21 **Case report** We report a patient with a severe LI phenotype who has a homozygous  
22 putative splicing mutation in *TGM1* gene. Our aim is to assess the pathologic effect of the  
23 *TGM1* c.984+1G>A by splicing assays and bioinformatic tools.  
24  
25  
26  
27  
28

29 **Results** c.984+1G>A mutation created two alternative *TGM1* mRNA splice variants that  
30 included 30 or 32 nucleotides of the 5' of intron 6. At the protein level, the partial in-frame  
31 aberrant transcript retaining 30bp of intron 6 led to the insertion of ten amino acids  
32 (p.Met329\_Val330ins10) at the catalytic core domain of *TGM1* protein (codons 247-572),  
33 whereas the transcript with the insertion of 32 nucleotides is predicted to encode a truncated  
34 protein (p.Val330MetfsX12).  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

44 **Conclusion** Our splicing assay, together with bioinformatic prediction tools, support the  
45 pathological effect of the recently identified c.984+1G>A mutation in the *TGM1* gene and  
46 unravel the molecular mechanism by which c.984+1G>A acts.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a rare, nonsyndromic, heterogeneous disorder of cornification. Classification schemes have been recently revised and redefined into three clinical subtypes, lamellar ichthyosis (LI; OMIM 242300), congenital ichthyosiform erythroderma (CIE; OMIM 242100) and harlequin ichthyosis (HI; OMIM 242500)<sup>1</sup>. In the majority of patients, LI is caused by TGase1 deficiency resulting from mutations in both copies of the Transglutaminase 1 (*TGMI*) gene in chromosome 14. TGase1 is responsible for cross-linking epidermal proteins during formation of the stratum corneum. To date, more than 115 *TGMI* mutations have been reported in the literature associated with LI/CIE phenotypic spectrum in patients from diverse ethnic backgrounds<sup>2</sup>. However, only the c.877-2A>G (IVS5-2A>G) splice-site mutation has been characterized at the molecular level<sup>3-5</sup>.

### Case Report

The patient was an 11-year-old Caucasian girl with LI who was the second child of non-consanguineous parents. She had been born premature and encased in a collodion membrane without other congenital anomalies. There was no family history of congenital ichthyosis or other skin diseases. On physical examination she presented generalized whitish plate-like scales on the whole body (Figure 1.1), including the face and the flexural sites. She had severe ectropion due to tightness of facial skin. The palms and soles presented marked hyperkeratosis. She had peripheral alopecia on the scalp but her hair was otherwise normal. There was neither hypoplasia of nasal or auricular cartilage nor teeth abnormalities. Her hearing was normal and extracutaneous symptoms were not found. Her intellectual and physical development was also normal. No erythema was observed when

1  
2  
3  
4 the patient was not taking oral retinoids. She had been treated with intermittent courses of  
5  
6 acitretin at dosages of 0.5-1mg/Kg/day since the age of 3 years.  
7

8  
9 A biopsy had been performed at the age of 2 months. Light microscopy showed a thick  
10  
11 orthokeratotic stratum corneum and a normal granular layer with mild acanthosis. Electron  
12  
13 microscopy findings were consistent with ichthyosis congenita type I. Lipid droplets were  
14  
15 observed in the cornified cells (Figure 1.2). There were no cholesterol clefts, elongated  
16  
17 membrane structures or membrane packages.  
18  
19

20  
21 After getting the informed consent, DNA was extracted from lymphocytes of blood  
22  
23 specimens from our patient, her parents and 100 healthy controls. Mutation analysis of  
24  
25 *TGM1* gene revealed the change c.984+1G>A (Genebank NM\_000359.2) in homozygous  
26  
27 state in the patient and in heterozygous state in her parents. This change was recently  
28  
29 described as a putative splice-site mutation by Herman *et al.*<sup>2</sup>. c.984+1G>A was not found  
30  
31 in the sequence analysis of 100 normal, unrelated Spanish individuals (data not shown). As  
32  
33 c.984+1G>A is a change in the first nucleotide of intron 6, a donor splice-site that suggest a  
34  
35 putative effect on the splicing, we analyzed mRNA from peripheral blood lymphocytes by  
36  
37 RT-PCR.  
38  
39

40  
41 cDNA was amplified with a forward primer located between the end of exon 5 and the  
42  
43 beginning of exon 6 (ACCTGGAACACTACGGCCAGTTTGAC) and a reverse primer in  
44  
45 exon 8 (GCTAGTCTCTTGGGGTGTGGCATCC). Sequencing of RT-PCR products was  
46  
47 performed with exon 5/6 primer and an internal exon 7 primer  
48  
49 (CGGAATATCCCGTGCGTAGGT).  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Our study revealed that the c.984+1G>A mutation was associated with two aberrant products (Figure 2). In all samples, from cases and controls, a natural isoform without exon 7 ( $\Delta$ exon 7) was also detected (Genbank accession number: BankIt1434830 Seq1 JF419518). Direct sequencing with an internal primer in exon 7, to avoid  $\Delta$ exon 7 transcripts, yielded a fragment of 256 nucleotides in normal controls, and two larger transcripts that included 30 or 32 nucleotides of the 5' end of intron 6 in both homozygous and heterozygous carriers (Figure 3). At the protein level the partial in-frame aberrant transcript retaining 30bp of intron 6 led to the insertion of ten amino acids (p.Met329\_Val330ins10), whereas the transcript with the insertion of 32 nucleotides is predicted to encode a truncated protein (p.Val330MetfsX12).

Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>) was used to predict 5' and 3' splice sites. Two cryptic donor sites, 32 and 30bp downstream from the constitutive donor site, were predicted (Figure 3, red triangles).

To determine how this in frame insertion affects TGM1, we modeled wild-type and mutated TGM1 protein with the program ESyPred3D<sup>6</sup> using as template the human coagulation factor XIIIa (1ex0.pdb). The insertion creates a new loop in the surface of the catalytic domain, which is likely to interfere with the proper folding yielding a modified structure that is less stable and more susceptible to proteolytic cleavage (Figure 3.2.c).

### Discussion

To date seven putative splice-site mutations have been identified<sup>2</sup>. However, only c.877-2A>G, the most common *TGM1* mutation, has been characterized by RNA analysis from keratinocyte culture or punch biopsies of carrier patients. c.877-2A>G affects the

1  
2  
3  
4 canonical splice acceptor site of intron 5, leading to two different consequences on TGM1  
5 mRNA processing: transcripts retaining intron 5<sup>5</sup> and transcripts with only a G nucleotide  
6 inserted between exons 5 and 6<sup>3</sup>. The present of both transcripts together in c.877-2A>G  
7 carriers was confirmed by Shevchenko *et al.*<sup>4</sup>. Both of these variants predict the premature  
8 termination of TGM1 protein translation from an in-frame stop codon.  
9  
10  
11  
12  
13

14  
15  
16 Here we present the results of the pathological effect of c.984+1G>A, found in  
17 homozygous state in a severe LI patient. To our knowledge, this is the second splice-site  
18 TGM1 mutation characterized. The disruption of the constitutive donor site by the  
19 c.984+1G>A mutation resulted in the activation of two cryptic sites located 32 and 30 bp  
20 downstream codon 6. The two mRNA transcripts, led both to a premature stop codon and to  
21 an in-frame insertion with consequences in the structure of the catalytic core domain of  
22 TGM1. This pathological effect is supported by electron microscopy findings.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32  
33 In summary, we have ascertained the pathological effect of the recently  
34 identified c.984+1G>A mutation in the *TGM1* gene using a peripheral blood sample from  
35 the patient and bioinformatics tools. Interestingly, the level of TGM1 in peripheral blood  
36 allowed us to unravel the pathologic mechanism by which c.984+1G>A acts.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

#### 47 **Acknowledgments**

48  
49 We are grateful to the family for their cooperation. L.Fachal is supported by Isabel Barreto  
50 program from Xunta de Galicia.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

- 1 V. Oji, G. Tadini, M. Akiyama *et al.* Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 607-641.
- 2 M. L. Herman, S. Farasat, P. J. Steinbach *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: 537-547.
- 3 M. Pigg, T. J. Gedde-Dahl, D. Cox, I. Hausser, I. Anton-Lamprecht, N. Dahl. Strongfounder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 589-596.
- 4 Y. O. Shevchenko, J. G. Compton, J. R. Toro, J. J. DiGiovanna, S. J. Bale. Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies. *Human Genetics* 2000; 106: 492-499.
- 5 M. Huber, I. Rettler, K. Bernasconi *et al.* Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995; 267: 525-528.
- 6 C. Lambert, N. Leonard, X. De Bolle, E. Depiereux. ESYPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 2002; 18: 1250-1256.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

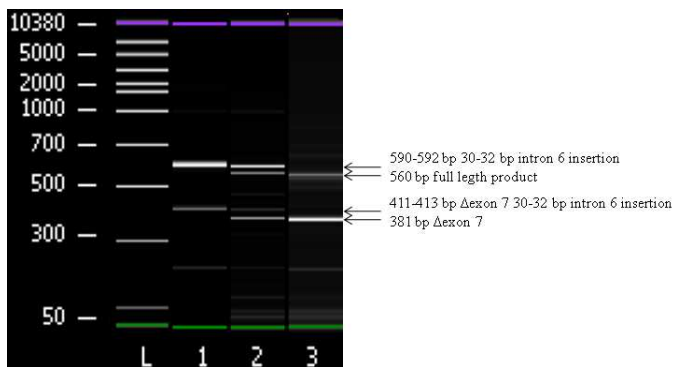
#### Figure legends

Figure 1. Clinical characteristics and electron microscopy from the patient's skin. 1.1 Plate-like scales on the back when the patient is taking oral retinoids. 1.2. Ultrastructural features of the skin biopsy specimen showing lipid vacuoles in the horny layer.

Figure 2. The intron 6 donor splice site mutation leads to two alternative TGM1 mRNA splice variants. The lanes represent RT-PCR analysis of TGM1 mRNA from lymphocytes of homozygote (lane 1) a heterozygote carrier (lane 2) and one of the ten unrelated normal individuals studied (lane 3).

Figure 3. Schematic representation shows up wild-type (a) and mutated (b) gDNA, RNA, cDNA and protein sequences. Exons are drawn as grey boxes and red boxes highlight the inserted region from intron 6. Known constitutive signals are displayed as blue (5') or green (3') triangles, while cryptic donor sites are represented as red triangles. Ribon diagrams (c) show wild-type TGM1 model (blue, left); TGM1 model (yellow, centre) harbouring ten inserted amino acids (red) and view of the p.Met329\_Val330ins10 site (right)

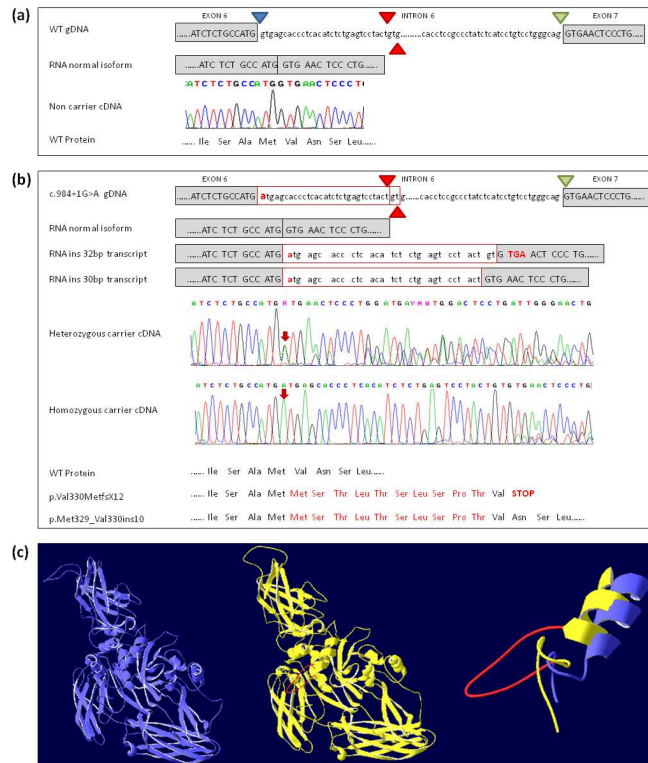
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



190x101mm (96 x 96 DPI)

Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



279x330mm (96 x 96 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



949x635mm (82 x 82 DPI)

Review

II.3. ANALYSIS OF *TGM1*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* AND *CYP4F22* IN AUTOSOMAL RECESSIVE CONGENITAL ICHTHYOSIS FROM GALICIA (NW SPAIN): EVIDENCE OF FOUNDER EFFECTS

Laura Rodríguez-Pazos, Manuel Ginarte, Laura Fachal, Jaime Toribio, Ángel Carracedo, Ana Vega.

Enviado para su publicación al British Journal of Dermatology.

British Journal of Dermatology

British Association  
of Dermatologists

**Analysis of TGM1, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 and CYP4F22  
in Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis from Galicia  
(NW Spain): evidence of founder effects.**

Journal:	<i>British Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	BJD-2011-0301.R1
Manuscript Type:	Concise Communication
Date Submitted by the Author:	06-Apr-2011
Complete List of Authors:	Rodríguez-Pazos, Laura; Complejo Hospitalario Universitario, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Department of Dermatology Ginarte, Manuel; Complejo Hospitalario Universitario, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Department of Dermatology Fachal, Laura; Fundación Pública de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER Toribio, Jaime; Complejo Hospitalario Universitario, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Department of Dermatology Carracedo, Ángel; Fundación Pública de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER Vega, Ana; Fundación Pública de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER
Keywords:	ichthyosis, TGM1, ALOXE3, autosomal recessive congenital ichthyosis, founder effects

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Analysis of *TGMI*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPALA* and *CYP4F22* in Autosomal**  
4  
5 **Recessive Congenital Ichthyosis from Galicia (NW Spain): evidence of founder**  
6  
7 **effects.**  
8  
9

10  
11 L. Rodríguez-Pazos<sup>1</sup>, M. Ginarte<sup>1</sup>, L. Fachal<sup>2</sup>, J. Toribio<sup>1</sup>, A. Carracedo<sup>2</sup>, A. Vega<sup>2</sup>.  
12  
13

14 <sup>1</sup>Department of Dermatology, Complejo Hospitalario Universitario, SERGAS, Faculty  
15 of Medicine, Santiago de Compostela, Spain.  
16  
17

18  
19 <sup>2</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS. Grupo de Medicina  
20 Xenómica-USC, CIBERER, IDIS, Santiago de Compostela, Spain.  
21  
22

23  
24 **Running head:** Founder effects in Spanish ARCI patients  
25  
26

27  
28 **Number of words:** 1335. **Number of tables:** 3. **Number of figures:** 0.  
29  
30

31  
32 **Correspondence Address:**  
33

34  
35 Dra. Laura Rodríguez Pazos,  
36  
37 Departamento de Dermatología,  
38  
39 Facultad de Medicina,  
40  
41 C/. San Francisco s/n,  
42  
43 15782 Santiago de Compostela, Spain.  
44  
45 Telephone: +34881812246,  
46  
47 Fax: +34981547094,  
48  
49 e-mail: ladrizos@hotmail.com  
50  
51

52 **Funding Sources:** None.  
53

54 **Conflict of Interest Disclosure:** None declared.  
55

56  
57 **Key words:** *TGMI*, *ALOXE3*, ichthyosis, autosomal recessive congenital ichthyosis,  
58  
59 founder effect.  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### What's already known about this topic?

- Although several studies have described mutations in *TGMI* and other genes associated with ARCI in isolated patients or families, few of them have analyzed the spectrum of mutations in specific populations.

#### What does this study add?

- This is the first report describing the clinical characteristics and spectrum of mutations in ARCI patients from Spain.
- The mutation frequency distribution in our population is different from the previously reported.
- We identified a high percentage of patients carrying the same mutations and a high number of homozygous probands, suggesting the existence of a strong founder effect in our population.
- We estimated a global prevalence of 1:138000 which rises to 1:50000 in the coast area of Galicia (NW Spain).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUMMARY

**Background:** Mutations in six genes have been identified in autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI). To date, few studies have analyzed the spectrum of these mutations in specific populations.

**Objectives:** We have studied the characteristics of ARCI patients in Galicia (NW Spain).

**Methods:** We recruited patients by contacting all dermatology departments of Galicia and the Spanish patient organization for ichthyosis. *TGMI*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* and *CYP4F22* were analyzed in the patients and their relatives.

**Results:** We identified 16 families comprising 20 members affected by ARCI and estimated a prevalence of 1:138000. Seventeen patients were clinically categorized as lamellar ichthyosis (LI) and three as congenital ichthyosiform erythroderma (CIE). *TGMI* and *ALOXE3* mutations were identified in 75% of the probands whereas no *ALOX12B*, *NIPAL4* and *CYP4F22* mutations were found. *TGMI* mutations were responsible for 68.75% of ARCI and 84.62% of LI probands. *ALOXE3* mutations were identified in a single patient with CIE. Remarkably, mutations p.Arg760X, p.Asp408ValfsX21 and c.984+1G>A of *TGMI* were present in six, four and two families accounting for 40.91%, 22.73% and 13.64% of all *TGMI* mutated alleles respectively.

**Conclusions:** The high percentage of patients with the same *TGMI* mutations, together with the high number of homozygous probands (63.64%) indicates the existence of a strong founder effect in our population.

1  
2  
3 INTRODUCTION  
4  
5

6 Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a rare, heterogeneous  
7 keratinization disorder of the skin. The estimated prevalence of ARCI is 1:200000-  
8 300000 in the USA,<sup>1</sup> but it may be more common in certain regions such as Norway  
9 (1:91000) owing to a founder effect.<sup>2</sup> Classically, it is divided into two clinical subtypes,  
10 lamellar ichthyosis (LI) and congenital ichthyosiform erythroderma (CIE). Patients with  
11 LI have big, dark, plate-like scales with no severe erythroderma while those with CIE  
12 show variable erythroderma and generalized fine scaling. Harlequin ichthyosis (HI) has  
13 been recently included in this group of disorders.<sup>3</sup>  
14  
15

16 ARCI is a genetically heterogeneous disease. Mutations in *TGMI* are  
17 responsible for the majority of LI patients and some cases of CIE.<sup>2</sup> Mutations in  
18 *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4*, *CYP4F22* and *ABCA12* have also been detected in ARCI  
19 patients.<sup>3</sup> Although several studies have described mutations in *TGMI* and other genes  
20 associated with ARCI in isolated patients or families, few of them have analyzed the  
21 spectrum of mutations in specific populations.<sup>2,4-6</sup>  
22  
23  
24  
25

26 The aim of our study was to investigate the clinical characteristics, prevalence  
27 and range of *TGMI*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* and *CYP4F22* mutations in ARCI  
28 families from Galicia (NW Spain).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 MATERIALS & METHODS  
52  
53

54 Patients were recruited through contacts with the Spanish Association of  
55 Ichthyosis Patients (ASIC) and via letters to all dermatology departments in Galicia. All  
56 patients and family members consented to participate in a protocol approved by the  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

local ethical committee of our Institution involving examination by two dermatologists, a medical and dermatologic history, clinical photography and collection of blood samples. The diagnosis was based on the revision of the medical records and the clinical and histopathological evaluation when the patient was not under systemic retinoid treatment.

#### **Mutation analysis**

DNA was extracted from peripheral blood. All patients were analysed for *TGMI* mutations by bi-directional sequencing of exons and flanking intronic splice sites. Those patients without mutations in the *TGMI* gene were analyzed by the same technique for *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* and *CYP4F22*. Primer sequences and protocols are available on request. Co-segregation analysis was performed for all families with identified mutations.

**Analysis of control individuals:** 200 chromosomes from healthy individuals of our population were genotyped for the missense variants detected.

**In silico analysis:** Assessments of the potential effect of non-synonymous substitutions on protein function were performed by PolyPhen, Align GVGD and SIFT.

**Molecular modelling:** The human coagulation factor XIIIa (template 1EX0.pdb) and the rabbit 15-LOX (template 2P0M.pdb) were used to model *TGM1*,<sup>7</sup> and *ALOXE3*,<sup>8</sup> respectively.

**Statistical analysis:** Fisher's Exact Test was used to compare clinical features between carriers and non-carriers of biallelic *TGMI* mutations. *P* values were adjusted by Bonferroni correction for multiple testing. The statistical analyses were carried out by the package R (<http://www.r-project.org/>).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### Clinical and epidemiological studies

Twenty subjects with a diagnosis of ARCI and 47 unaffected relatives were recruited from 16 Galician families. Two of the families were consanguineous (families 13, 14). Family 1 and 10 have been reported previously.<sup>9,10</sup> From our study we are able to estimate the global prevalence of ARCI in Galicia, which is 1:138000. If we consider the southwest coast area, where the majority of Galician families come from, the prevalence increases to 1:50000. Seventeen (85%) of the patients were clinically categorized as LI and three (15%) as CIE. The clinical features of the affected individuals are summarized in Table 1.

### Genetic analyses and molecular modelling

We identified mutations in twelve out of 16 ARCI families (75%), 11 probands with LI and a single proband with CIE. Seven probands (63.64%) were homozygous carriers and the remaining four (36.36%) were compound heterozygous carriers. Seven different germline mutations were identified in our population (Table 2). The most frequent mutation was p.Arg760X. This mutation accounts for 40.91% of the mutational *TGM1* alleles in Galician probands. Another recurrent mutation in our population was p.Asp408ValfsX21, detected in four families (22.73% of *TGM1* mutated alleles). Moreover, we identified the splice site mutation c.984+1G>A in two unrelated families. Other mutations detected were: p.Trp263X, p.Glu520Gly, p.Arg396His and the novel p.Thr491Met. *In silico* analysis and molecular modelling were performed to study the identified missense mutations (Table 2).

### Genotype-phenotype correlation

1  
2  
3                    Eleven out of 13 probands with a clinical phenotype of LI (84.62%) were  
4  
5                    biallelic carriers of *TGMI* mutations. The main difference between *TGMI* carriers and  
6  
7 non-carriers was the type of scales (Table 3).  
8  
9

#### 10 11 12 13 14 DISCUSSION

15  
16  
17                    To date, mutations in *TGMI*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPALA*, *CYP4F22* and  
18  
19 *ABCA12* have been described in ARCI patients. Mutations in these genes have been  
20  
21 found in 78% of patients with the following distribution: 32% *TGMI*, 16% *NIPALA*,  
22  
23 12% *ALOX12B*, 8% *CYP4F22*, 5% *ALOXE3* and 5% *ABCA12*.<sup>11</sup> In Galicia we  
24  
25 identified mutations in 75% of the probands but the mutation frequency distribution was  
26  
27 different. *TGMI* accounted for 68.75% of the cases and *ALOXE3* mutations were  
28  
29 detected in a single patient. No mutations were identified in *ALOX12B*, *NIPALA* and  
30  
31 *CYP4F22*. We could not identify the causative mutations in four cases, suggesting the  
32  
33 involvement of *ABCA12* or other loci.  
34  
35  
36  
37  
38

39  
40                    It is noteworthy that three different *TGMI* mutations were identified in more  
41  
42 than one family. Mutations p.Arg760X, p.Asp408ValfsX21 and c.984+1G>A were  
43  
44 present in six, four and two families accounting for 40.91%, 22.73% and 13.64% of all  
45  
46 *TGMI* mutated alleles respectively. These mutations are uncommon and have been  
47  
48 previously identified only once.<sup>7,12</sup> Genealogical investigations of these families did not  
49  
50 reveal common ancestors or consanguinity over the last four generations.  
51  
52  
53

54  
55                    Many studies have attempted to compare the clinical characteristics of ARCI  
56  
57 patients with and without *TGMI* mutations. Recent studies found that the presence of a  
58  
59 collodion membrane at birth, ectropion, plate-like scales and alopecia was significantly  
60  
associated with *TGMI* mutations<sup>6</sup> while erythema was more frequent in patients without

1  
2  
3 them.<sup>5</sup> Our results also suggest that patients with *TGMI* mutations are more severely  
4 affected as they were all classified as LI. The type of scales was the main difference  
5 between both groups as plate-like scales were identified in all patients with *TGMI*  
6 mutations. Collodion membrane at birth, prematurity and ectropion were also more  
7 frequent among *TGMI* carriers. A variable phenotypic expression among and within  
8 ARCI families and patients has also been reported.<sup>4</sup> Four of our patients were  
9 homozygous for p.Arg760X and another three carried the same genotype  
10 p.Asp408ValfsX21/p.Arg760X. Patients with the same mutations shared most of the  
11 clinical features although mild differences could be observed regarding the presence and  
12 degree of ectropion, alopecia and erythema, even in members of the same family. These  
13 results must be interpreted with care as most patients of our population share the same  
14 mutations and their phenotypic heterogeneity could be reduced.

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
The ARCI prevalence in Europe has been estimated to be 1 in 200000.<sup>1</sup> In Spain  
the estimated prevalence may be of 1:139000 (data pending publication). Our  
prevalence for Galicia is 1:138000, which rises to 1:50000 in the coast area. As in the  
region there is not a reference centre for ichthyosis and most patients are not members  
of ASIC, there might be some patients not recruited for the study. We think the number  
of hidden patients is low, and in case they exist, it would mean that the real prevalence  
could be even higher. The high Galician ARCI prevalence could be due to the presence  
of founder effects. The fact that Galicia has been an isolated region of Spain for many  
years supports this proposition.<sup>13</sup> In this sense, other specific Galician mutations have  
been described for several diseases.<sup>14,15</sup>

In summary, we have studied the characteristics of ARCI patients in Galicia.  
*TGMI* and *ALOXE3* mutations were identified in 75% of ARCI families whereas no  
*ALOX12B*, *NIPAL4* and *CYP4F22* were found. *TGMI* mutations are the most frequent,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

being responsible for 68.75% of ARCI and 84.62% of LI probands in our population. Remarkably, mutations p.Arg760X, p.Asp408ValfsX21 and c.984+1G>A were found in 81.82% of ARCI families with *TGMI* mutations, accounting for 70.83% of all mutated alleles. The high percentage of patients with these mutations, together with the high number of homozygous probands (63.64%) indicates the existence of a strong founder effect in our population. Further haplotype studies from our families will shed light into the history of ARCI in Galicia.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the families for their cooperation and to dermatologists for referring new families. We thank Maria Magdalena Castro, Eva Fernández Gradaille and Miriam Pérez Iglesias for the excellent technical assistance. L.F. is supported by Isabel Barreto program from Xunta de Galicia and Fondo Social Europeo.

## REFERENCES

1. Bale SJ, Doyle SZ. The genetics of ichthyosis: a primer for epidemiologists. *J Invest Dermatol* 1994;102:49S-50S.
2. Pigg M, Gedde-Dahl T Jr, Cox D, *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;6:589-96.
3. Oji V, Tadani G, Akiyama M, *et al.* Revised nomenclature and classification of inherit ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:607-41.
4. Laiho E, Ignatius J, Mikkola H, *et al.* Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *Am J Hum Genet* 1997;61:529-38.
5. Ganemo A, Pigg M, Virtanen M, *et al.* Autosomal recessive congenital ichthyosis in Sweden and Estonia: clinical, genetic and ultrastructural findings in eighty-three patients. *Acta Derm Venereol* 2003;83:24-30.
6. Farasat S, Wei MH, Herman M, *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;46:103-11.
7. Herman ML, Farasat S, Steinbach PJ, *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;30:537-47.
8. Eckl KM, de Juanes S, Kurtenbach J, *et al.* Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. *J Invest Dermatol* 2009;129:1421-8.
9. Rodríguez-Pazos L, Ginarte M, Vega-Gliemmo A, *et al.* Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the transglutaminase-1 gene. *Int J Dermatol* 2009;48:1195-7.
10. Fachal L, Rodríguez-Pazos L, Ginarte M, *et al.* Characterization of TGM1 c.984+1G>A mutation identified in a homozygous carrier of lamellar ichthyosis. *Int J Dermatol. In Press* 2011.
11. Fischer J. Autosomal recessive congenital ichthyosis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1319-21.
12. Shevchenko YO, Compton JG, Toro JR, *et al.* Splice-site mutation in TGM1 congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogic, and clinical studies. *Hum Genet* 2000;106:492-9.
13. Salas A, Comas D, Lareu MV, *et al.* mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet* 1998;6:365-75.
14. Vega A, Torres M, Martínez JI, *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Ann Hum Genet* 2002;66:29-36.
15. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, *et al.* High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clinical Endocrinology* 2006;64:330-6.

Table 1. Summary of patients, clinical phenotypes and mutation data for ARCI patients from Galicia.

- <sup>1</sup> Number indicates family and letter the affected individual in families with more than one patient studied  
<sup>2</sup> M=Male F=Female  
<sup>3</sup> Age at the moment of the study  
<sup>4</sup> A plus sign (+) indicates the presence of condition, a minus sign (-) the absence and MD missing data  
<sup>5</sup> B=black, W=white  
<sup>6</sup> T=topic, R=oral retinoids  
<sup>7</sup> Probands  
<sup>8</sup> Analyzed also for *ALOX12B*, *ALOXE3*, *NIPAL4* and *CYP4F22*  
<sup>9</sup> Defined as non-deleterious variant by Eckl et al, 2009

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

Id <sup>1</sup>	Sex <sup>2</sup>	Age <sup>3</sup>	Collodion Membrane <sup>4</sup>	Prematurity <sup>4</sup>	Plate-like Scales <sup>4</sup>	Fine Scales <sup>4</sup>	Scale Color <sup>4</sup>	Erythema <sup>4</sup>	Exotropion <sup>4</sup>	Alopecia <sup>4</sup>	Palmo-plantar Hyperkeratosis <sup>4</sup>	Treatment <sup>6</sup>	Clinical Diagnosis	Affected gene	Variants identified
1 <sup>7</sup>	M	2	+	MD	+	-	B	-	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[2278C>T]H[2278C>T]
2A <sup>7</sup>	F	25	-	-	+	-	B	-	-	-	+	R	LI	TGMI	c.[2278C>T]H[2278C>T]
2B	F	56	+	+	+	-	B	-	+	+	+	T	LI	TGMI	c.[2278C>T]H[2278C>T]
3 <sup>7</sup>	F	27	+	+	+	-	W	-	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[2278C>T]H[2278C>T]
4 <sup>7</sup>	M	1	+	+	+	-	B	-	+	-	-	T	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]H[2278C>T]
5 <sup>7</sup>	F	31	+	+	+	-	B	+	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]H[2278C>T]
6 <sup>7</sup>	F	7	+	-	+	-	W	-	+	-	+	T	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]H[2278C>T]
7 <sup>7</sup>	M	46	+	+	+	-	B	+	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]H[1223_1227delACACA]
8A <sup>7</sup>	F	16	+	+	+	-	B	-	+	-	+	T	LI	TGMI	c.[788G>A]H[788G>A]
8B	F	9	+	+	+	-	W	-	+	-	+	T	LI	TGMI	c.[788G>A]H[788G>A]
9A <sup>7</sup>	F	80	-	-	+	-	W	-	+	+	+	T	LI	TGMI	c.[984+1G>A; 1559A>G]H[187G>A]
9B	F	84	MD	+	+	-	W	-	+	+	+	T	LI	TGMI	c.[984+1G>A; 1559A>G]H[187G>A]
10 <sup>7</sup>	F	11	+	+	+	-	W	-	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[984+1G>A; 1559A>G]H[984+1G>A; 1559A>G]
11A <sup>7</sup>	M	56	+	-	+	-	B	-	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[1472C>T]H[1472C>T]
11B	M	52	+	-	+	-	B	-	+	+	+	R	LI	TGMI	c.[1472C>T]H[1472C>T]
12 <sup>7,8</sup>	F	15	-	-	-	+	B	-	-	+	+	R	CIE	-	-
13 <sup>7,8</sup>	F	36	+	-	+	+	W	+	-	-	+	T	CIE	-	-
14 <sup>7,8</sup>	F	16	+	+	+	-	B	-	+	+	+	R	LI	-	-
15 <sup>7,8</sup>	F	43	-	+	-	+	W	-	+	+	+	R	LI	ALOXE3	c.[709T>A]H[4]=
16 <sup>7,8</sup>	M	4	-	-	-	+	W	+	-	-	-	T	CIE	ALOXE3	c.[434G>A]H[1186C>A]

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

Table 2. Characteristics of mutations detected in this report.

- <sup>1</sup> Mutation nomenclature: The Human Genome Sequence Variation (HGSV) guideline was followed. Reference sequences *TGMI* (NM\_000359.2, NP\_000350.1), *ALOX12B* (NM\_001139.2, NP\_001130.1), *ALOXE3* (NM\_021628.2, NP\_067641.2), *NIPAL4* (NM\_001099287.1, NP\_001092757.1), *CYP4F22* (NM\_173483.3, NP\_775754.2), were used for nucleotides and proteins, respectively.
- <sup>2</sup> Polyphen <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
- <sup>3</sup> SIFT [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_aligned\\_seqs\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html)
- <sup>4</sup> AGVGD [http://agvgd.iarc.fr/agvgd\\_input.php](http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)
- <sup>5</sup> Modelled by ESYPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/turbm/bioinfo/esyprd/>) and visualized with Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).
- <sup>6</sup> Defined as non-deleterious variant by Eckl et al. 2009

	Gene	Nucleotide change <sup>1</sup>	Amino acid change <sup>1</sup>	Exon/Domain	Variation type	N° mutated alleles % (per gene)	N° control alleles %	Polyphen prediction <sup>2</sup>	SIFT prediction <sup>3</sup>	AGVGD prediction <sup>4</sup>	Folding changes <sup>5</sup>
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10	<i>TGMI</i>	c.788G>A	p. Trp263X	Exon 5 Core domain	Nonsense	2 9.09%	-				
11											
12	<i>TGMI</i>	c.984+1G>A	ND	Intron 6 Core domain	Splice site	3 13.64%	-				
13											
14	<i>TGMI</i>	c.1223_1227delACACA	p. Asp408ValfsX21	Exon 8 Core domain	Frameshift	5 22.73%	-				
15											
16	<i>TGMI</i>	c.1187G>A	p. Arg396His	Exon 9 Core domain	Missense	1 4.54%	0	Damaging	Affects protein function	More likely to interfere with function	Changes in H-bonds with proximal residues
17											
18	<i>TGMI</i>	c.1472C>T	p. Thr491Met	Exon 10 Core domain	Missense	2 9.09%	0	Benign	Affects protein function	Less likely to interfere with function	Packaging of the hydrophobic Methionine residue into a more hydrophobic environment
19											
20	<i>TGMI</i>	c.1559A>G	p. Glu520Gly	Exon 11 Core domain	Missense	-	2 1%	Benign	Tolerated	Less likely to interfere with function	Changes in H-bonds with proximal residues
21											
22	<i>TGMI</i>	c.2278C>T	p. Arg760X	Exon 15 Beta-barrel 2	Nonsense	9 40.91%	-				No
23											
24	<i>ALOXE3</i>	c.434G>A	p. Arg119GlyfsX12	Exon 3 Core domain	Splice site	1 50.00%	-				
25											
26	<i>ALOXE3</i>	c.709T>A <sup>6</sup>	p. Leu237Met	Exon 6 Core domain	Missense	-	0	Benign	Tolerated	Less likely to interfere with function	No
27											
28	<i>ALOXE3</i>	c.1186C>A	p. Arg396Ser	Exon 9 Core domain	Missense	1 50.00%	0	Damaging	Affects protein function	More likely to interfere with function	The change to a less polar and smaller residue makes Serine to package in the interior of the protein
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											
39											
40											
41											
42											
43											
44											
45											
46											
47											

Table 3. Analysis of clinical features in carriers and non-carriers of TGM1 mutations.

<sup>1</sup> Fisher's Exact Test

<sup>2</sup> Corrected by Bonferroni multiple test correction

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

For Peer Review

		TGM1 mutation carriers (n=11)	TGM1 mutation noncarriers (n=5)	p	Corrected p <sup>2</sup>
7					
8	Collodion Membrane	Yes (n=11)	2 (40)	0.2445	1
9	n (% Patients)	No (n=5)	3 (60)		
10		Yes (n=8)	2 (40)	0.7308	1
11	Prematurity	No (n=7)	3 (60)		
12	n (% Patients)	Missing (n=1)	0 (0)		
13		Yes (n=12)	1 (20)	0.0028	0.0308
14	Plate-like scales	No (n=4)	4 (80)		
15	n (% Patients)	Yes (n=4)	0 (0)	0.0028	0.0308
16		No (n=12)	1 (20)		
17	Fine scales	Black (n=9)	2 (40)	0.5962	1
18	n (% Patients)	White (n=7)	3 (60)		
19	Color	Yes (n=4)	2 (40)	0.5467	1
20	Erythema	No (n=12)	3 (60)		
21	n (% Patients)	Yes (n=12)	2 (40)	0.0632	0.6952
22		No (n=4)	3 (60)		
23	Ecotropion	Yes (n=10)	3 (60)	1	1
24	n (% Patients)	No (n=6)	2 (40)		
25		Yes (n=13)	4 (80)	1	1
26	Palmo-plantar keratosis	No (n=3)	1 (20)		
27	Treatment	Topic (n=6)	2 (40)	1	1
28	n (% Patients)	Systemic (n=10)	3 (60)		
29	Clinical Diagnosis	LI (n=13)	2 (40)	0.0179	0.1969
30	n (% Patients)	CIE (n=3)	3 (60)		

## II.4. MULTIPLE LOCAL AND RECENT FOUNDER EFFECTS OF *TGM1* SPANISH FAMILIES

Laura Fachal, Laura Rodríguez-Pazos, Manuel Ginarte, Jaime Toribio, Antonio Salas, Ana Vega.

Manuscrito en preparación.

**TITLE PAGE**

Multiple local and recent founder effects of *TGMI* Spanish families

Laura Fachal<sup>1</sup>, Laura Rodríguez-Pazos<sup>2</sup>, Manuel Ginarte<sup>2</sup>, Jaime Toribio<sup>2</sup>, Antonio Salas<sup>3</sup>,  
Ana Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER, IDIS, Santiago de Compostela, Spain.

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario, Santiago de Compostela, Spain.

<sup>3</sup>Unidade de Xenética, Instituto de Medicina Legal, Facultade de Medicina and Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, Spain.

Corresponding author:

Ana Vega

Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica

Choupana s/n, 15706

Santiago de Compostela, Galicia, Spain

Phone: +34-981951491

Fax: +34-981951473

E-mail address: ana.vega@usc.es

**Abstract**

Mutations in the *TGMI* gene encoding transglutaminase 1 are a major cause of autosomal recessive congenital ichthyosis. In the Galician (NW Spain) population, three mutations, c.2278C>T, c.1223\_1227delACAC and c.984+1G>A, were observed at high frequency, representing the ~46%, ~21% and ~13% of all *TGMI* gene mutations, respectively. Moreover, these mutations were reported only once outside Galicia, pointing to the existence of historical episodes of local severe genetic drift in this region. In order to determinate whether the two most frequent mutations were inherited from a common ancestor in the Galician population, and to estimate the number of generations since their appearance, we carry out a haplotype-based analysis using twenty one SNPs within and flanking the *TGMI* gene and ten flanking polymorphic microsatellite markers spanning a region of 12Mb. Two linkage disequilibrium based methods were used to estimate the time of the most recent common ancestor (TMCRA), while a Bayesian-based procedure was used to estimate the age of the two mutations. Haplotype reconstruction from unphased genotypes of all members of the affected pedigrees indicated that all carriers for each of the two mutations harbored the same haplotypes, indicating common ancestry. In good agreement with the documentation record and the census, both mutations arose about 3,000 years ago, but their TMCRA is about 1,200; pointing to the existence of historical bottlenecks in the region followed by population growth.

**Keywords:** *TGMI*, Founder Mutation, Galicia, TMCRA

**INTRODUCTION**

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a rare, nonsyndromic, heterogeneous disorder of cornification, defined into three clinical subtypes which includes the spectrum of lamellar ichthyosis (LI; OMIM 242300) and congenital ichthyosiform erythroderma (CIE; OMIM 242100) as so as harlequin ichthyosis (HI; OMIM 242500), that has been recently included in this group of disorders.<sup>1</sup> In the majority of patients, ARCI is caused by transglutaminase 1 deficiency resulting from mutations in both copies of the Transglutaminase 1 gene (*TGMI*) in chromosome 14.<sup>2</sup>

During the *TGMI* mutation screening of a Galician (NW Spain) ARCI cohort (Rodríguez Pazos et al, 2011), we indentified some frequent mutations in several families and, surprisingly, three of them (c.2278C>T, c.1223\_1227delACACA and c.984+1G>A) in a homozygous status in six apparently non-consanguineous families. *TGMI* mutations c.2278C>T, c.1223\_1227delACACA and c.984+1G>A were present in seven, four and two families accounting for 45.83%, 20.83% and 12.5% of all *TGMI* mutated alleles respectively (Table 1).

The estimated prevalence of ARCI in the USA is 1:200,000-300,000, while in Europe, it has been estimated to be around 1 in 200,000 persons.<sup>3</sup> ARCI seems however to be more frequent in Norway (1:91,000) owing to founder effects.<sup>4</sup> The estimated prevalence of ARCI in Galicia, giving a census population of 2.8 million people, is about 1:122,000 (23 identified patients). However, most of the cases were observed in a local coastal Galician district (Figure 1), and therefore, the prevalence of ARCI in this area reaches the highest values reported in the literature to date, namely, 1:33,000 (see below).

As in Norway,<sup>4</sup> the high prevalence of ARCI in Galicia could have been due to founder effects and/or local consanguinity. Alternatively, the background haplotype structure of the original mutations in the Galician population could also favor the presence of mutational hotspots at the *TGMI* gene.

The present study has been stimulated by the facts that Galicia seems to show one of the highest prevalence of ARCI worldwide, and the observed mutations in Galician carriers (c.2278C>T, c.1223\_1227delACACA and c.984+1G>A) were reported only once outside the Galician territory. A better characterization of the mutations responsible for ARCI would also help to design efficient mutational screening procedures and genetic counseling in Galicia.

It is possible to discriminate between a founder mutation and a mutational hotspot determining whether a specific mutation arises on a common genetic background or appears to occur independently multiple times. Moreover, in case of confirming that a mutation is a true founder mutation, the size of the conserved region surrounding the mutation can be used to estimate the age of the mutation. Therefore, the aim of our study was: (i) to determine if the c.2278C>T, c.1223\_1227delACACA and c.984+1G>A *TGMI* mutations were inherited from a common ancestor in the Galician population, and (ii) to estimate the number of generations since the appearance of these mutations in our population. The results will be discussed in a demographic context as inferred from the historical record.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Families**

The patients were recruited through contacts with the Spanish patient organization for ichthyosis and *via* mailing to all dermatology departments in Galicia (NW Spain). All patients and family members consented to participate in a protocol approved by the local ethical committee of our Institution involving examination by a dermatologist, a medical and dermatologic history, clinical photography and collection of blood samples for DNA analysis. The mutation status was determined using bi-directional sequencing as previously described (Rodríguez Pazos et al, 2011).

Pedigrees were reconstructed for at least three generations (Supplemental Figure 1) and demographic data of patients were obtained to determine their geographic origin (Figure 1). All apparently unrelated affected families originated from the same geographical area along the west-central coast of Galicia (the district called 'Rias Baixas'). The families were geographically mapped along the region according to their parent's birthplaces.

### **Genotyping**

We originally used HapMap CEU data to choose tag SNPs spanning 10kb upstream and downstream of *TGMI*. We took into account non-monomorphic SNPs, previously detected by sequencing in the course of the genetic test of our patients, and two common variants, c.1559A>G and c.2160C>T that were observed in Galician control population (minimum allele frequency (MAF) of 0.01 and 0.015, respectively), and that were forced to be selected as tag SNPs using HAPLOVIEW v4.1.<sup>5</sup> Altogether, twenty-one SNPs spanning 10 kb

upstream and downstream *TGM1* region were genotyped by a combination of SNaPshot minisequencing and bi-directional sequencing on a ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). SNaPshot results were analyzed with GeneMapper v4 Software (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Due to the fact that carriers shared a common SNP haplotype, the genotyped region on chromosome 14q11 was spanned to 12Mb using ten highly polymorphic microsatellite markers (Figure 2). Microsatellite data was obtained from UniSTS database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists)). Forward PCR primers were labeled with either FAM or HEX fluorescent dyes (Sigma-Genosys Ltd. Cambridgeshire, UK). The multiplexed amplification products were separated on the ABI3730XL and resulting data was analyzed with GeneMapper v4 Software.

All reactions were performed according to manufacturer's protocols. Primers sequences and PCR conditions are described in the Supplemental data (Supplemental Tables 1, 2 and 3).

#### **Haplotype reconstruction**

To assign allelic phase in the families, from trio datasets, and in the 100 control individuals the software PHASE v2.1<sup>6,7</sup> was used and double checked manually. The haplotypes for one deceased patient were inferred from data of non affected parents and brother (Family 17, supplemental data Figure 1 and Table 4).

#### **Estimation of founder mutation age**

Two linkage disequilibrium based methods were used to estimate the time of the most recent common ancestor (TMRCA), Bergman's<sup>8</sup> and Risch's<sup>9</sup> estimators. In addition, the age of the mutations was obtained using the Bayesian method implemented in the software DMLE+2.3.<sup>10</sup>

The number of generations back to the TMRCA using linkage disequilibrium based methods was first computed individually for each marker surrounding the mutation; then, the number of generations was averaged over all markers. To determine the founder allele, and following Bergman et al.<sup>8</sup>, we adopted the strategy of choosing the most frequent allele outside the common region among individuals having the disease causing mutation, hence the conserved haplotype. The physical distances were converted into centimorgans (cM) assuming that a sex averaged recombination rate of 1.36cM ~ 1Mb<sup>11</sup>. We used Kosambi map function for translation of map distances into recombination frequencies.

Labuda et al.<sup>12</sup> found discrepancies between the demographic and the genetic data reported in the Risch et al. study<sup>9</sup>. Labuda et al.<sup>12</sup> proposed a correction that is used here (instead of the Risch's estimator) that accounts for the population growth rate  $p$ , which was estimated from the equation  $N = N_0 e^{gp}$ , where  $N$  is the estimated present population size,  $N_0$  is the estimated size of the population at reference time and  $g$  is the number of generations between these two time points. The population of the Galician region at the present time is well documented by the Galician Statistical Institute (<http://www.ige.eu>), comprising 2,796,089 inhabitants. The 1591 census, which estimated the population of the six provinces comprising Galician region in 629,336 habitats<sup>13</sup>, offers a global figure of Galician

population in that period. Assuming 30 years per generation<sup>14</sup>, the population growth rate was calculated to be 0.107.

The method implemented in DMLE+ version 2.3 software package (<http://www.dmle.org/>), which is an extension of the Bayesian linkage disequilibrium method of Rannala and Reeve<sup>10</sup>, was also used to estimate the age of the mutations, which is not necessarily the same as the age of their TMRCAs. This program was initially designed for high-resolution mapping of a disease mutation based on the observed linkage disequilibrium between the mutation and linked markers. It uses the Markov chain Monte Carlo (MCMC) method to generate the marginal posterior probability density of mutation age, based on the observed haplotypes in normal and affected chromosomes, map distances between markers and mutation site, fraction of mutated chromosomes sampled and estimated population growth rate.

The proportion of mutation-carrying chromosomes sampled was estimated on the assumptions that: (i) we genotyped all the ARCI cases in the Galician population, finding four homozygous patients for the c.2278C>T mutation and one homozygous patient for c.1223\_1227del, and (ii) in case of selection it would operate against patients (biallelic carriers, we do not consider heterozygous advantage or disadvantage) being relatively mild due to the low frequency of the disease. Therefore, using the Hardy-Weinberg equilibrium equation, we estimated the allele frequencies of c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA mutations in our population to be 0.1196% and 0.0598%, respectively. Therefore, the proportion of mutation-carrying chromosomes sampled was estimated to be 0.000033 and 0.000030, respectively.

A cautionary note should be added concerning the several factors that concerns the estimation of the age of the founder mutations and TMRCA: (i) recombination frequencies differ in different genetic maps and human population groups, (ii) the original founder allele is unknown; and (iii) no estimates can be obtained when the founder allele frequency on control chromosomes is more common than in disease chromosomes. On the other hand, estimates based on growth rate, such as the Labuda's correction and DMLE, are also a source of variability; thus, for instance, historical population data based on parish population records contain errors that are difficult to estimate. Moreover, we are assuming a constant and exponential growth rate, which could be not realistic; thus for instance, Galician population experienced periods of fast population growths and decreases (see below). On the other hand, the DMLE method needs data on the proportion of the population sampled, which is calculated based on the assumption of the frequency of studied mutations in the actual population and assuming Hardy–Weinberg principles. Notwithstanding, the TMRCA estimates obtained in the present study were consistent when using different statistical approaches; the age of the mutations according to DMLE showed slightly older (not overlapping) estimates than the TMRCA, which however could be consistent with the demographic history of the population (see below).

## RESULTS

### Mutation c.2278C>T

Seven families were carrier of the c.2278C>T mutation, four of them in a homozygous state (Families 1, 2, 3 and 17). However, two members of family 2 suffered from LI, the proband and her maternal uncle. Therefore three different alleles could be evaluated, two from the proband and one from her maternal uncle (i.e. the second disease allele from the maternal branch not transmitted to the proband by her mother). We found a common 2.6cM haplotype that included all the *TGMI* intragenic markers and fourteen markers located close to *TGMI* (from D14S1032 to D14S581, Supplemental Table 4). The control chromosomes displayed a large number of different haplotypes for these markers. However, none of the 200 normal chromosomes shared the patient's haplotype. The remaining six markers diverged into several haplotypes. Two alleles (2.IV.4.A and 17.III.3.A) shared a common haplotype of 15.25cM, (from D14S1060 to D14S742) indicating a possible closer relationship between the different families (families 2 and 17); however, no familiar relationship was reported in four generations.

The markers used for estimating the mutation age and estimates are shown in Table 2. The age of the TMRCA of c.2278C>T was estimated to be 42 generations by Bergman estimator (95% CI: 22-62) and 25 generations by Risch estimator (95% CI: 13-36). Due to the fact that the allele 9 of the marker D14S1060 was less common in the disease population (0.25) than among the normal controls (0.16), this marker did not provide any information when the Bergman estimator was used. Similarly, the marker D14S1043 could not be evaluated by the Risch method owing to the frequency of the allele present in the common region was the same as the previous marker. Using the correction proposed by

Labuda et al.<sup>12</sup>, for the Risch method the average generations of the TMRCA increased to 36 (95% CI: 21-52).

The age of the c.2278C>T mutation, according to the Bayesian method implemented in DMLE, is of approximately 96 generations ago (95% Bayesian CI: 80-122).

**Mutation c.1223\_1227delACACA**

The *TGMI* mutation c.1223\_1227delACACA was found in four families, once in a homozygous state (Family 7). The haplotype in the short conserved genotype (1.33cM from marker D14S581 to D14S264, Supplemental Table 4) of five disease chromosomes is rare in control population (0.02) which supports the idea that it is a common founder mutation.

The markers used for estimating the mutation age and estimates are shown in Table 2. The marker D14S1060 could not be used by the Risch estimator owing to the frequency of the allele 10 was the same as the most adjacent marker of the conserved region. The marker D14S1043 was not evaluated neither by Bergam nor by Risch estimators due to the facts that (i) the founder allele 3 was more common in control (0.73) than in disease population (0.4), and (ii) that this allele has the same frequency as the adjacent marker of the conserved region. Average TMRCA estimated age of the c.1223\_1227delACACA *TGMI* mutation was calculated to be 26 generations (95% CI: 20-33) by the Bergman estimator and 28 generations (95% CI 25-31) by the Risch estimator. When the correction proposed by Labuda et al.<sup>12</sup> was used, the average of generations increased to 41 (95% CI 35-48).

The age of the c.1223\_1227delACACA *TGMI* mutation according to the DMLE software was 94 generations (95% Bayesian CI: 72-124).

**Mutation c.984+1G>A**

Three patients from two apparently unrelated families were carriers of c.984+1G>A, once in a homozygous state. Haplotype analysis revealed a common haplotype spanning 1.42cM (from D14S742 to D14S1032, Supplemental Table 4) absent in control population. Due to the low number of c.984+1G>A carrying chromosomes, the estimation of the TMRCA and the coalescent age of the mutation was not investigated.

**DISCUSSION**

In order to explore whether the high frequency of the c.2278C>T, c.1223\_1227delACACA, and c.984+1G>A *TGM1* mutations in Galician population were due to a founder effect or any other factor (e.g. mutational hotspot), we searched for evidences of a shared common haplotypes in family carriers.

Recruited patients were asked about their genealogy. Pedigrees were reconstructed for at least three generations and demographic data were obtained to determine their geographic origin. The demographic distribution within the regional map of Galicia revealed that most of the affected families originate from the same geographical area along the west-central coast, named 'Rías Baixas', which is today the most densely populated region of Galicia, with a census population size of 750,000 inhabitants, which therefore indicates a extremely high prevalence of 1 in 33,000 compared to other worldwide populations.

The results indicate that carriers of the two studied pathogenic mutations descended from a common recent ancestor each. The TMRCA and the age of the mutation were estimated for the two mutations. Thus, depending on the method used, the TMRCA of c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA mutations were calculated to be originated in the range of 34 and 39 generations ago (averaging the Bergman's and the Labuda's estimates). The DMLE method identified the time at which the mutations appeared in approximately 94-96 generations. Therefore, while the TMRCA dates to about ~1,000 to ~1,200 years ago (y.a.) for the two pathogenic mutations, the mutation event could be significantly older, namely, 2,800 to 2900 y.a. Therefore, our study points to the existence of strong founder effects occurred in the Galician population in recent times. Three studied pathogenic

mutations seem to be placed in three different uncommon or inexistent haplotypes in control population, and two of them could be dated as occurring only about 3,000 y.a. There are two possible scenarios that could explain the results: The *TGMI* mutations, c.2278C>T and c.1223\_1227del, arose in Galician region at about 2,800-2,900 y.a., branching out into unrelated Galician individuals since a population bottleneck before 1,000-1,200 y.a. reduced the haplotype diversity to the two common ancestors of the actual c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA haplotypes. Alternatively, these two mutations could have been introduced by immigrants arriving to the west-central coast of Galicia about 1,000-1,200 years ago, branching out into the today's observed haplotypes.

Estimates of the population size of the Galician population 1,000 y.a. are about 170,000 habitants (in contrast to the 2.8 million people today). Thus, when the mutations first appeared or arrived from other populations, the allele frequency would be about 1/340,000 (0.00029%) for each mutation. The reason of the survival and increase of these mutations to high frequencies in the Galician population could be in the congregation of the predominantly rural Galician population into isolated parish, followed by rapid growth from a limited group of founders. It is well documented an abrupt decrease of the number of habitants in the mid s. XIV due to the famine and the Black Dead, followed by consecutive cycles of slight decreases and acute increases of population, being the most remarkable one the population growth experienced in Galicia during the s.XVI, when according to the census, at that time the populations doubled its size. This demographic scenario, coupled with the relative isolation of Galicia from the rest of the Iberian Peninsula owing to its location and complex orography (its sinuous reliefs and geographic barriers that constitute the eastern mountains that separates Galicia from the rest of the Peninsula)

have probably contributed to keep these mutations confined to Galicia for centuries, with little spread outside favored by the very well documented massive migrations occurred during the beginning of the last century (specially to Central Europe and South America). This marked tendency to isolation and the cultural identity of the region have created a particular genetic identity<sup>15</sup>. The high frequency of Galician founder pathogenic mutations reported to the date<sup>16,17</sup> would be also in good agreement with this demographic scenario.

Taking all the evidences together, it seems more plausible that the two mutations c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA were founded in the Galician territory instead of being brought here by migrants.

In conclusion, the data indicates that c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA *TGM1* mutations are not mutational hotspots. These two mutations most likely arose in Galicia about 3,000 y.a., although the TMRCA date to about only 1,200 y.a., testifying for the existence of strong genetic drift occurring in this region at that time. The estimated ages fit well with a documented demographic scenario that involved drastic population size reductions in the Galicia population; therefore paving the ground for strong local founder effects and endogamy in local Galician areas, followed by more recent population growth but strong isolation from the rest of the Iberian Peninsula till very recent times.

**Acknowledgements:**

We are grateful to the families for their cooperation and to dermatologists for referring new families. We thank Maria Magdalena Castro, Eva Fernández Gradaille, and Miriam Pérez Iglesias, for their excellent technical assistance. L.F. is supported by Isabel Barreto program from Xunta de Galicia and Fondo Social Europeo.

Supplementary information is available at The European Journal of Human Genetics's website.

1. Oji V, Tadini G, Akiyama M *et al*: Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol* 2010; **63**: 607-641.
2. Fischer J: Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 1319-1321.
3. Bale SJ DS: The genetics of ichthyosis: a primer for epidemiologists. *J Invest Dermatol* 1994; **102**: 49S-50S.
4. Pigg M, Gedde-Dahl TJ, Cox D, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Dahl N: Strongfounder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet* 1998; **6**: 589-596.
5. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263-265.
6. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *The American Journal of Human Genetics* 2001; **68**: 978-989.
7. Stephens M, Donnelly P: A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *The American Journal of Human Genetics* 2003; **73**: 1162-1169.
8. Bergman A, Einbeigi Z, Olofsson U *et al*: The western Swedish BRCA1 founder mutation 3171ins5; a 3.7 cM conserved haplotype of today is a reminiscence of a 1500-year-old mutation. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 787-793.
9. Risch N, de Leon D, Ozelius L *et al*: Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet* 1995; **9**: 152-159.
10. Reeve JP, Rannala B: DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics* 2002; **18**: 894-895.
11. Kong A GD, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K.: A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature Genetics* 2002; **31**: 241-247
12. Labuda D, Tkiewicz EZ, Labuda M, Gorzata: The Genetic Clock and the Age of the Founder Effect in Growing Populations: A Lesson from French Canadians and Ashkenazim. *The American Journal of Human Genetics* 1997; **61**: 768-771.

13. Varela XM BBX, Fernández Canosa XA , Portela Silva E, Pallares Méndez MC, Pérez García XM, Villares Paz R, Fernández Prieto L: *Nova Historia de Galicia*. A Coruña, 1996.
14. Tremblay M, Vézina H: New Estimates of Intergenerational Time Intervals for the Calculation of Age and Origins of Mutations. *The American Journal of Human Genetics* 2000; **66**: 651-658.
15. Salas A, Comas D, Lareu MV, Bertranpetit J, Carracedo Á: mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet* 1998; **6**: 365-375.
16. Vega A, Campos B, Bressac-de-Paillerets B *et al*: The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Human Mutation* 2001; **17**: 520-521.
17. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S *et al*: High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clinical Endocrinology* 2006; **64**: 330-336.

LEGEND TO THE FIGURES

**Figure 1.** Geographic distribution of the 16 ARCI Galician families. Black circles: homozygous c.2278C>T carriers. Black square: homozygous c.1223\_1227delACACA carrier. Grey squares: c.2278C>T /c.1223\_1227delACACA carriers. Grey circles: ARCI patients carriers of c.984+1G>A.

**Figure 2.** Schematic representation of the position of mutations, markers and observed disease haplotypes.

**Table 1.** Summary of patients and mutation data for c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA carrier. <sup>1</sup> Number indicates family and letter the affected individual in families with more than one patient studied. <sup>2</sup> M=Male F=Female <sup>3</sup> Age at the moment of the study.

Nucleotide change	Amino acid change	N° mutated alleles (%)	Id <sup>1</sup>	Sex <sup>2</sup>	Age <sup>3</sup>	Clinical Diagnosis	Gene	Alleles
c.2278C>T	p.Arg760X	11 (45.83)	1.IV.1	M	2	LI	TGMI	c.[2278C>T]+[2278C>T]
			2.IV.4	F	25	LI	TGMI	c.[2278C>T]+[2278C>T]
			2.III.5	F	56	LI	TGMI	c.[2278C>T]+[2278C>T]
			3.IV.4	F	27	LI	TGMI	c.[2278C>T]+[2278C>T]
			17.III.3	M	-	Non affected (father of deceased LI children)	TGMI	c.[2278C>T]+[=]
			17.III.4	F	-	Non affected (mother of deceased LI children)	TGMI	c.[2278C>T]+[=]
c.1223_1227delACACA	p.Asp408ValfsX21	5 (20.83%)	4.III.1	M	1	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]+[2278C>T]
			5.III.3	F	31	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]+[2278C>T]
			6.IV.2	F	7	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]+[2278C>T]
			7.III.1	M	46	LI	TGMI	c.[1223_1227delACACA]-[1223_1227delACACA]
c.984+1G>A	p.Met329_Val330ins10 p.Val330MetfsX12	3 (12.5%)	9.III.1	F	80	LI	TGMI	c.[984+1G>A]+[1187G>A]
			9.III.2	F	84	LI	TGMI	c.[984+1G>A]+[1187G>A]
			10.V.1	F	11	LI	TGMI	c.[984+1G>A]+[984+1G>A]

**Table 2.** Estimation of the TMRCA and the age (generations) of the c.2278C>T and c.1223\_1227delACACA mutations by Risch et al, Bergman et al. and the DMLE methods.

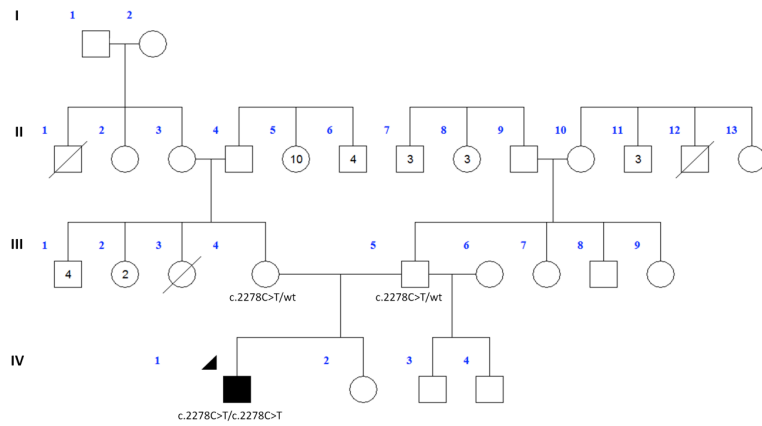
Mutation	Marker	Founder allele	Distance from mutation (Mb)	Bergman estimator	Risch estimator	Risch estimator adjusted by Labuda correction	DMLE
c.2278C>T	D14S1043	5	3.34	48	-	-	
	D14S72	3	3.32	79	39	60	
	D14S742	6	2.52	35	35	45	
	D14S275	8	1.98	24	24	37	
	D14S1042	1	4.54	23	16	26	
	D14S1060	9	8.7	-	9	14	
	<b>Single marker method: average (95%CI)</b>				42 (22-62)	25 (13-36)	36 (21-52)
<b>DMLE method: result (95% Bayesian CI)</b>							96 (80-122)
c.1223_1227delACACA	D14S1043	3	-	-	-	-	
	D14S72	5	3.33	22	31	52	
	D14S742	5	2.53	29	29	39	
	D14S275	6	1.97	28	28	41	
	D14S1042	3	4.53	24	24	34	
	D14S1060	10	8.69	12	-	-	
	<b>Single marker method: average (95%CI)</b>				26 (20-33)	28 (25-31)	41 (35-48)
<b>DMLE method: result (95% Bayesian CI)</b>							94 (72-124)

**SUPPLEMENTAL DATA**

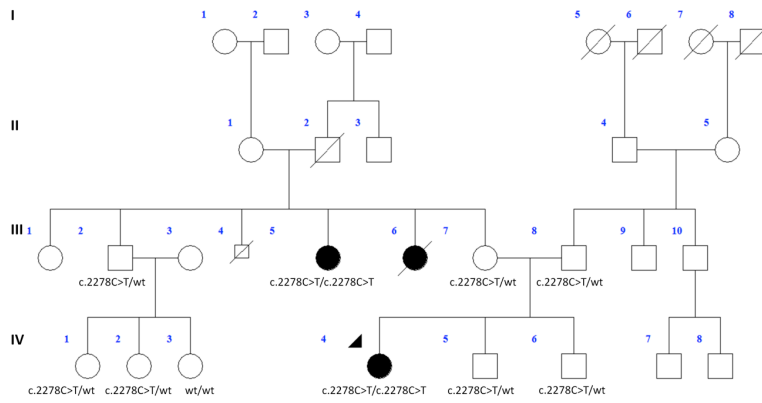
**Supplemental Figure 1**

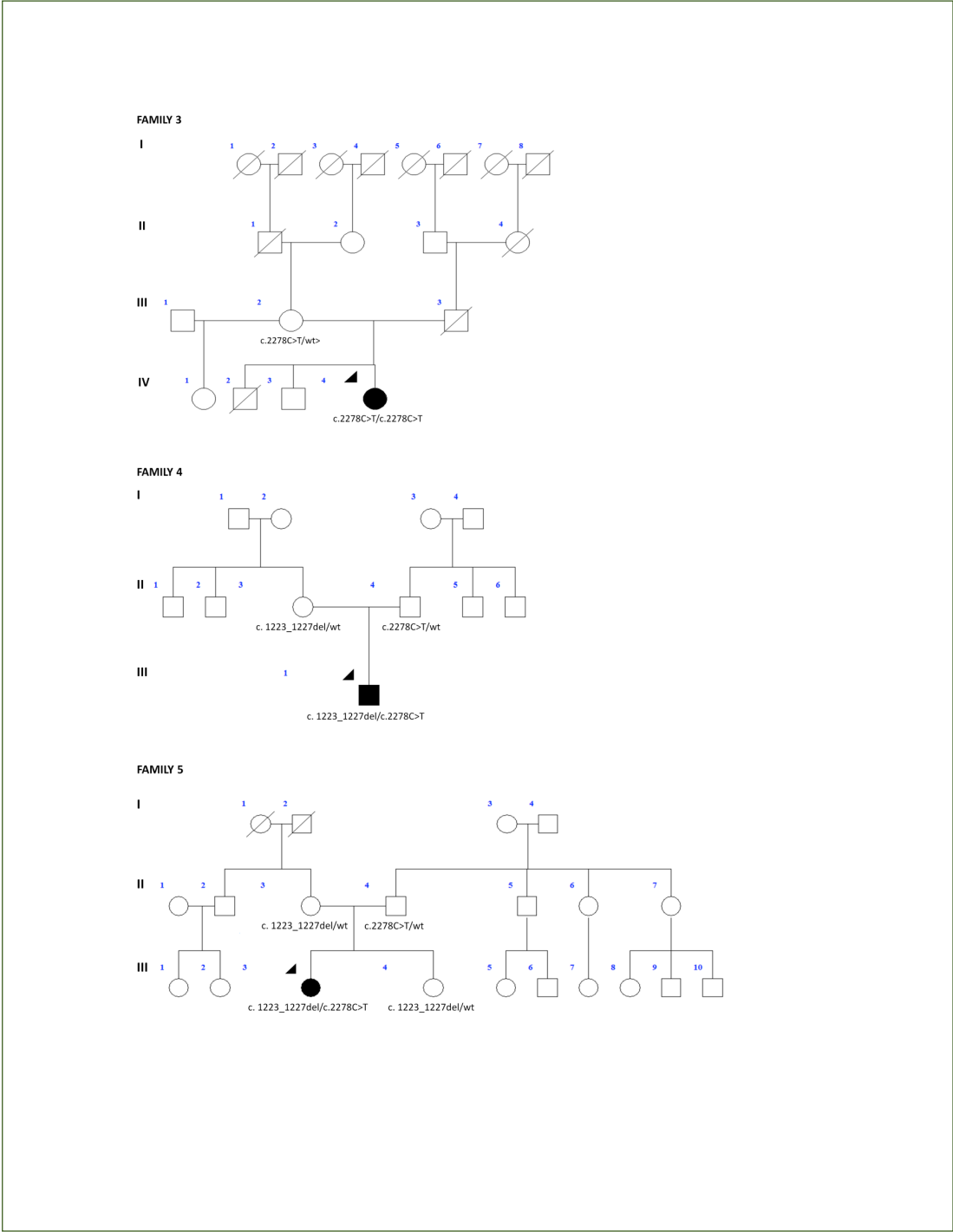
Reconstructed pedigrees from families included in the study.

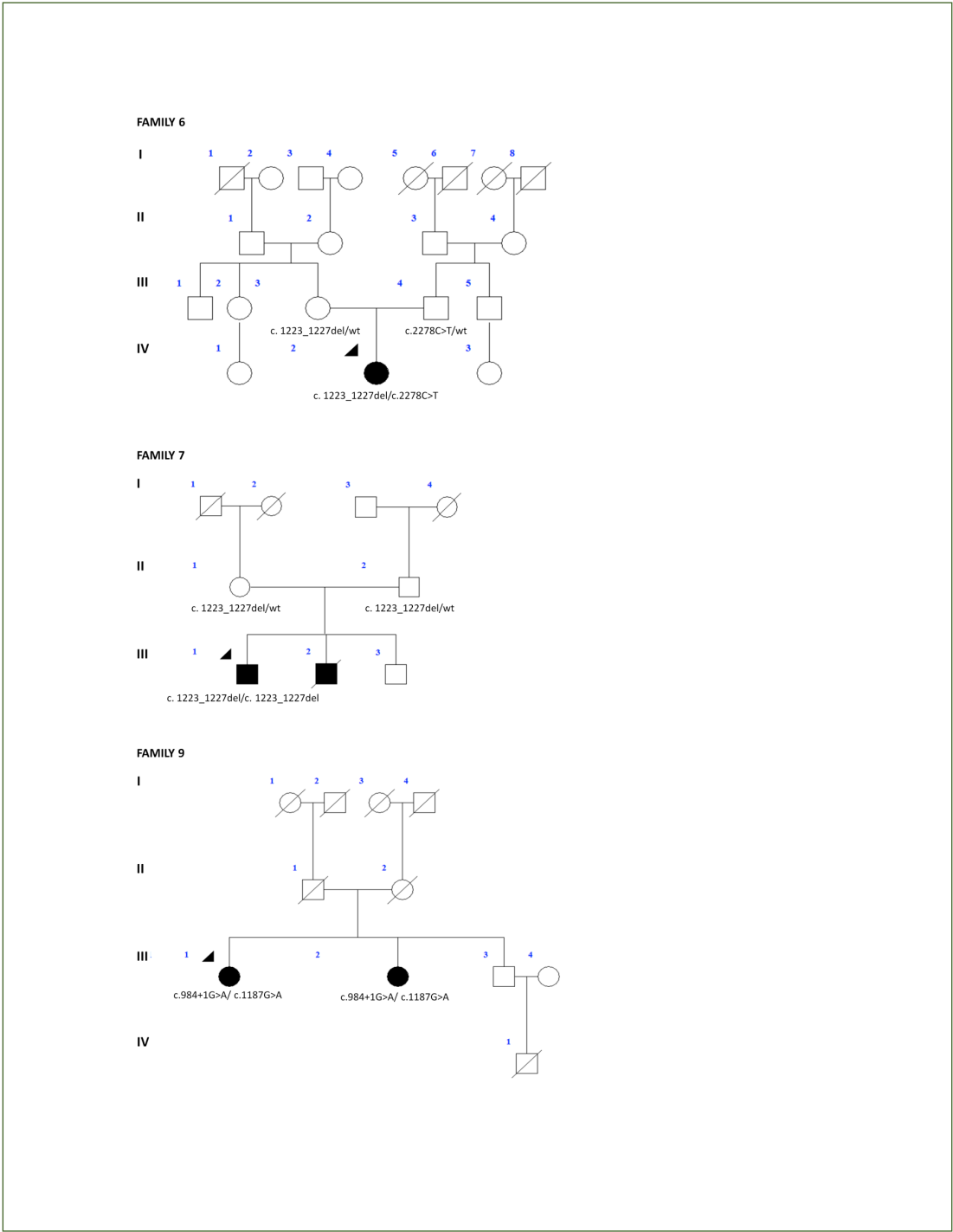
**FAMILY 1**

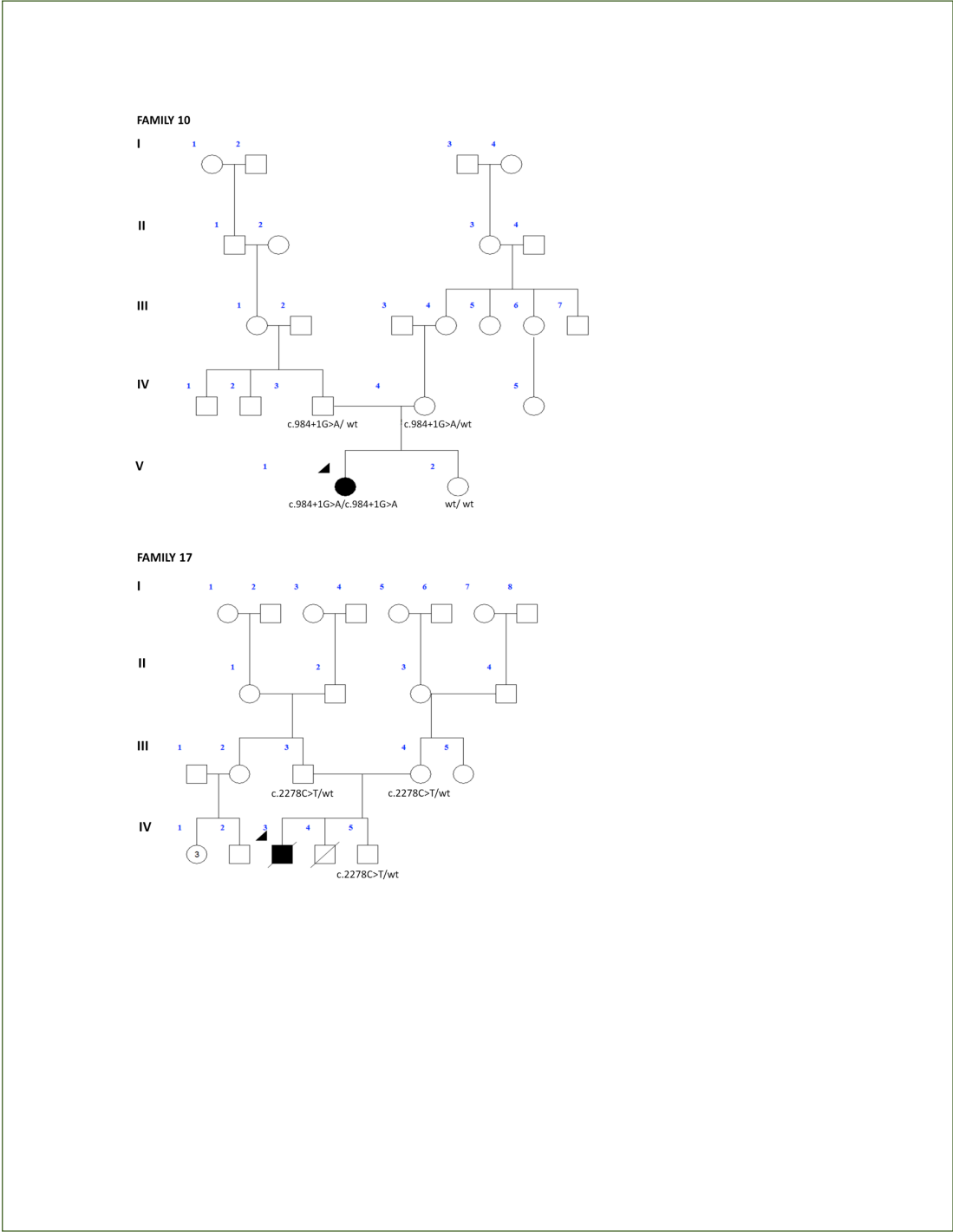


**FAMILY 2**











Supplemental Table 3

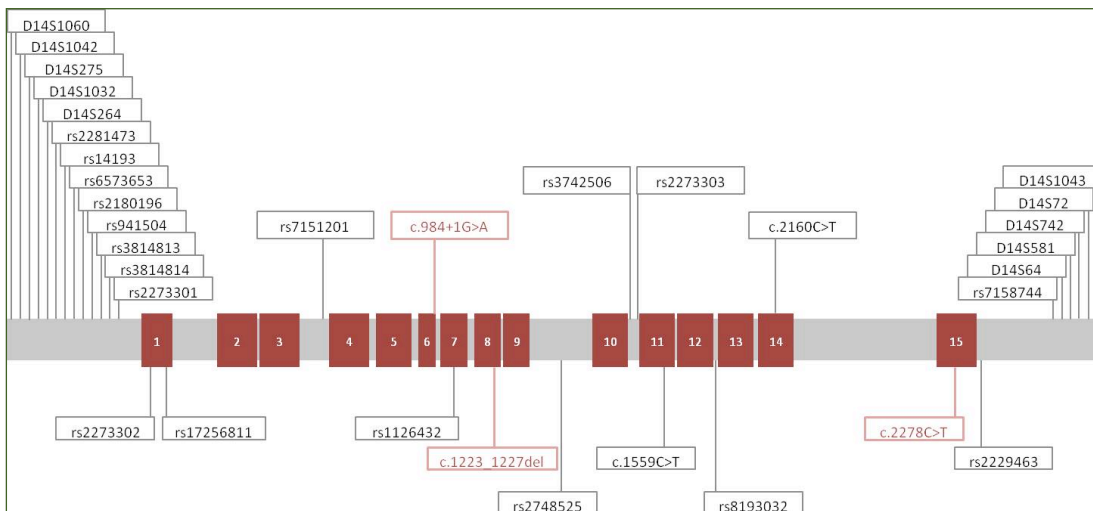
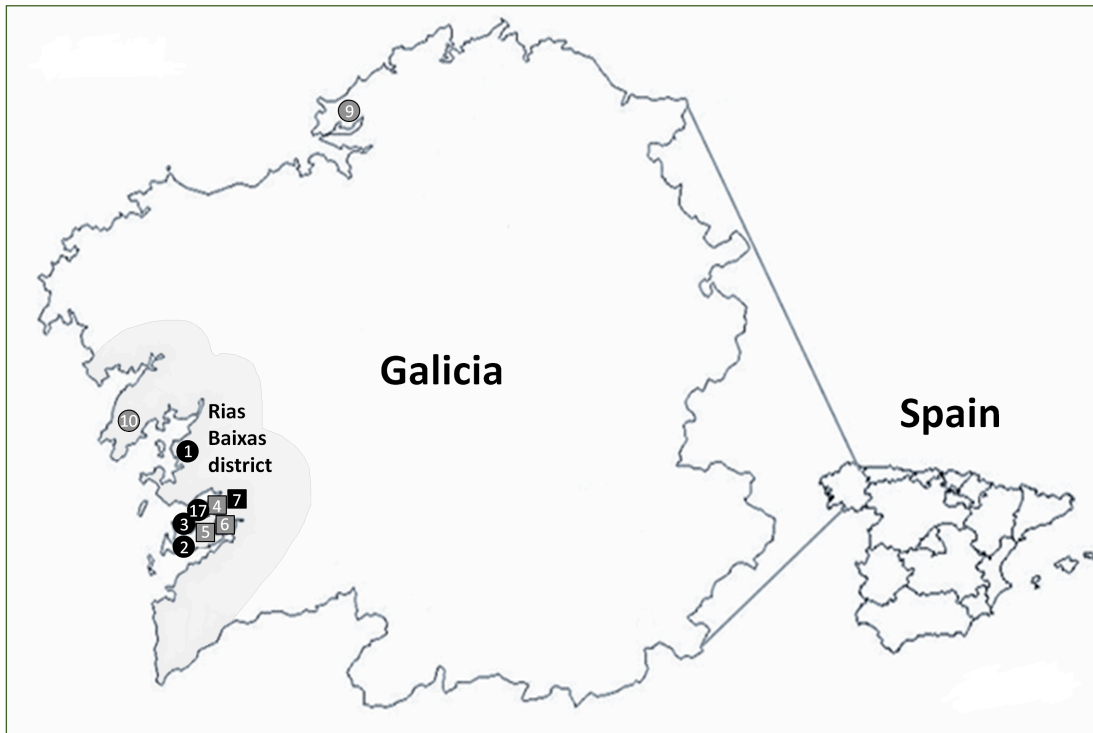
Microsatellite primers. PCR was performed in a total of 40 cycles using the following conditions: 94°C denaturation for 30 s, annealing at 70 °C for 3 min and extension at 72 °C during 90 s, followed by a 15 min of final extension at 68°C. <sup>1</sup> According to GenBank Accession sequence

Microsatellite	Primer	Sequense	Labeled by	GenBank Accession	Product size <sup>1</sup>
D14564	D14564F	AGCTGGGCAACACAGTGAGA	Fam	Z16540.1	137
	D14564R	CATGGGATAGAAGCAACACAGATGA			
D1451032	D1451032F	CCTGGGTGAAGAAATAATCTGTACAACA	Hex	Z53884.1	162
	D1451032R	CCATGTTGCCACAAATACAGGATT			
D145581	D145581F	TGAGGCCCTAAGAAACCATTACAT	Fam	G09040.1	181
	D145581R	CCTCTGTGCTTACTCTCACATT			
D145275	D145275F	AAGCATTCCCTTCTGGACACCAA	Hex	Z24107.1	193
	D145275R	AGTATCAGGCTTCTGGTACTCAATCTCT			
D1451060	D1451060F	TGACATGTTAAATGGGCCACAATA	Fam	Z51690.1	213
	D1451060R	AAAGAACTGTTATGTATCAGACCAACCCCTA			
D145264	D145264F	AGCCCCAAATATCACTCCAAATAGA	Hex	Z23348.1	227
	D145264R	AGAGTTGGCAACCCTCTGTCTCTG			
D14572	D14572F	TGGAGACTACAGGAATAATGATCAAGC	Fam	Z16878.1	264
	D14572R	GGCTATCTCAGACACTTGCATCTATG			
D1451042	D1451042F	CAAAGAAAGTAAATTAATCTGTGCATAACC	Hex	Z50925.1	281
	D1451042R	CAATTACAGGCACCTGCCATCA			
D1451043	D1451043F	TCAGGGCTTGAATATCACATAG	Fam	Z51382.1	367
	D1451043R	TCTGATACTGGAGCATAGGATGTGTG			
D145742	D145742F	TAGGGCTGGTTTCTTCATAACC	Hex	G10057.1	399
	D145742R	TGCCCTTAAATCAGTCTCTTAA			

Supplemental Table 4

Patients' phased haplotypes. The most common haplotype is indicated in grey boxes.

Mutation	Chr	D1451060	D1451042	D145275	D1455032	D145264	r2281472	r14198	r657269	r2180196	r941504	r3814834	r2272302	r2273302	r17256811	r97151201	c.984+1 G>A	r112 6412	c.1223_1227 del	r274626	r3745266	r2273303	c.1559A>G	r8193032	c.2160C>T	r1950498	c.2278 C>T	r222296 63	r7159746	D14564	D145742	D14572	D1451043		
c.2278C>T	1.IV.1.A	10	7	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	3	5
c.2278C>T	1.IV.1.A	12	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	3	7	3
c.2278C>T	2.IV.4.A	9	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	4	3
c.2278C>T	2.IV.4.B	10	5	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	7	3
c.2278C>T	2.III.5.A	10	6	7	4	6	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	2	3
c.2278C>T	3.IV.4.A	10	3	5	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	2	3
c.2278C>T	3.IV.4.B	4	3	5	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	7	3
c.2278C>T	4.III.1.A	7	7	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	8	3
c.2278C>T	5.III.3.A	8	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	2	3
c.2278C>T	6.IV.2.A	7	6	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	5	6	3
c.2278C>T	17.III.3.A	9	1	8	4	8	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	3	5
c.2278C>T	17.III.4.A	7	3	7	4	6	G	T	G	C	A	G	G	C	T	C	A	G	C	ACACA	C	G	A	A	T	C	C	T	T	T	6	2	6	3	5
c.1223_1227del	4.III.1.B	10	3	6	2	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	T	C	C	T	T	4	1	3	5	3
c.1223_1227del	5.III.3.B	4	6	8	6	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	T	C	C	T	T	6	2	5	3	7
c.1223_1227del	6.IV.2.A	4	6	8	6	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	T	C	C	T	T	6	2	3	3	4
c.1223_1227del	7.III.1.A	10	3	5	4	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	T	C	C	T	T	4	2	5	2	3
c.1223_1227del	7.III.1.	9	7	6	4	5	G	C	G	C	A	G	A	C	C	C	A	G	C	del	C	G	A	A	T	T	C	C	T	T	4	2	5	5	3
c.984+1G>A	9.III.1.A	10	8	8	4	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	C	4	2	3	7	3	
c.984+1G>A	10.V.1.A	10	3	5	4	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	4	2	5	2	3		
c.984+1G>A	10.V.1.B	10	1	5	7	5	G	T	C	C	A	C	A	C	C	C	A	C	ACACA	C	G	G	T	C	C	C	C	C	4	2	3	2	3		



## ABREVIATURAS

**A:** adenina.

**Å:** amstrong.

**ACMR:** antepasado común más reciente.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario.

**ADNds:** ADN de doble cadena.

**ADNg:** ADN genómico.

**AG:** ácidos grasos.

**ARC:** artrogriposis-disfunción renal-colestasis.

**Arg:** arginina.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**Asp:** ácido aspártico.

**BCAR:** bebé colodión autorresolutivo.

**BCARA:** bebé colodión autorresolutivo acral.

**pb:** pares de bases.

**C:** citosina.

**cM:** centimorgans.

**CEDNIK:** disgenesia cerebral-neuropatía-ictiosis-queratodermia.

**Complejo AP-1:** complejo adaptador de proteínas.

**Cys:** cisteína

**dNTP:** deoxinucleótido trifosfato.

**ddNTP:** dideoxinucleótido trifosfato.

**EIC:** eritrodermia ictiosiforme congénita.

**FTAP4:** proteína de transporte de ácidos grasos 4.

**G:** guanina.

**Glu:** ácido glutámico.

**Gly:** glicina.

**His:** histidina.

**HSF:** Human Splicing Finder.

**IA:** ictiosis arlequín.

**ICAR:** ictiosis congénita autosómica recesiva.

**IFAP:** ictiosis folicular-atricquia-fotofobia.

**IH:** ictiosis-hipotricosis.

**IHCE:** ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante.

**IL:** ictiosis laminar.

**ITB:** ictiosis en traje de baño.

**K:** queratina.

**Leu:** leucina.

**LOX:** lipoxigenasa.

**Lys:** lisina.

**MEDNIK:** retraso mental-enteropatía-sordera-neuropatía-ictiosis-queratodermia.

**Met:** metionina.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**Phe:** fenilalanina.

**Pro:** prolina.

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa-retrotranscriptasa.

**Ser:** serina.

**SNP:** “*Single Nucleotide Polimorphism*” Polimorfismo de Único Nucleótido.

**T:** timina.

**Ta:** temperatura de *annealing*.

**TGasa:** transglutaminasa.

**Thr:** treonina.

**Trp:** triptófano.

**Val:** valina.



## GLOSARIO

**Alelo:** cada una de las formas alternativas que puede tener un gen en una determinada posición o *locus* o un marcador particular en un cromosoma.

**Aminoácido:** compuesto orgánico que contiene un grupo de amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (-COOH). Pueden estar unidos por enlaces peptídicos para formar las cadenas polipeptídicas de las moléculas de proteínas.

**ARNm:** es el ARN que contiene la información genética procedente del ADN para utilizarse en la síntesis de proteínas. Cada juego de tres bases, llamado codón, codifica un aminoácido.

**Codón:** la información genética contenida en el ARNm se escribe con cuatro letras que se corresponden con las bases nitrogenadas del ARN (A, T, C, G). Estas letras se agrupan de tres en tres. Cada grupo de tres se llama codón y codifica un aminoácido, un codón de comienzo que da la señal de inicio a la transcripción proteica o un codón de parada que da la señal de terminación.

**ADN polimerasa:** familia de enzimas que catalizan la síntesis de ADN a partir de un molde de ADN por adición de nucleótidos que une al extremo 3' en crecimiento.

**Desequilibrio de ligamiento:** el desequilibrio de ligamiento es la asociación no aleatoria de los alelos en dos o más *loci*, no necesariamente en el mismo cromosoma. Algunas combinaciones de alelos o marcadores genéticos aparecen en la población con una frecuencia mayor a la esperable si los haplotipos se formaran aleatoriamente.

**Dominio:** región estructural y funcional de una proteína.

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** establece que la composición genética de una población permanece constante mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor evolutivo. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos *A* y *a*, con frecuencias alélicas de *p* y *q* respectivamente, el equilibrio de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto, *AA*, es  $p^2$ , la del heterocigoto, *Aa*, es  $2pq$  y la del homocigoto, *aa*, es  $q^2$ .

**Exón:** región del gen que se transcribe y forma parte del ARNm maduro.

**Fracción de recombinación:** cuanto mayor sea la distancia entre dos segmentos en un cromosoma, mayor posibilidad existe de que ocurra una recombinación entre ellos. La probabilidad de que ocurra una recombinación se conoce como fracción de recombinación y puede ser usada como una medida de la distancia entre dos segmentos de un cromosoma.

**Gen:** segmento de ADN que sirve como unidad de información hereditaria. Incluye una secuencia de ADN susceptible de transcripción, de donde se obtiene un producto proteico o ARN con función específica. La mayor parte de los genes eucariotas se encuentra en los cromosomas.

**Genoma:** término que habitualmente se refiere a todo el material genético de una célula u organismo.

**Haplotipo:** alelos de un cromosoma, o parte de ellos, que están próximos y que tienden a heredarse conjuntamente.

**Hotspot:** son puntos o zonas dentro del genoma donde se concentran mutaciones con una frecuencia mayor que la esperada si se distribuyeran al azar.

**Intrón:** secuencia de ADN no codificante de los genes eucariotas que se transcribe pero no se traduce. Interrumpe los exones y se elimina durante la maduración del transcrito primario (ARNm) mediante el proceso de *splicing*.

**Ratones *knockout*:** son ratones modificados genéticamente en los que uno o más genes se han inactivado para estudiar la función de los genes inactivados.

**Locus (*Loc*i):** localización física de un gen o secuencia de ADN en el cromosoma.

**Marcador genético:** cualquier gen o alteración física detectable en un cromosoma u organela citoplasmática utilizada como etiqueta específica para ese cromosoma o área cromosómica.

**Megabase (Mb):** unidad de longitud de fragmentos de ADN que es igual a un millón de bases.

**Mutación:** alteración o cambio en la información genética que puede afectar al fenotipo de un ser vivo y que, por lo tanto, puede producir un cambio de uno o varios caracteres.

**Tipos de mutaciones en función del cambio que producen en la secuencia nucleotídica:**

- **Delección:** mutación en la que se suprimen uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN.
- **Inserción:** mutación en la que se insertan uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN.

**Tipos de mutaciones en función del cambio aminoacídico que producen:**

- **Frameshift** (Mutación con desplazamiento del marco de lectura): cambio de la secuencia de ADN por adición o deleción de una o más bases (que no sean múltiplo de tres), lo que provoca un cambio de tripletes que altera los aminoácidos codificados por el ARNm mutado.
- **Missense** (Mutación con cambio de sentido): mutación puntual que cambia un codón codificante por otro que codifica para un aminoácido distinto.
- **Nonsense** (Mutación terminadora): Son mutaciones que cambian un codón que codifica para un aminoácido por un codón de parada, lo cual resulta en la terminación prematura de la proteína.
- **Splice-site**: las mutaciones de desplazamiento del marco de lectura también pueden surgir por mutaciones que interfieren con el *splicing* del ARNm. El comienzo y final de cada intrón en un gen están definidos por secuencias conservadas de ADN. Si un nucleótido muta en una de las posiciones altamente conservadas, el sitio no funcionará más, con las consecuencias predecibles para el ARNm y la proteína codificada.

**PCR** (Polimerase Chain Reaction): reacción en cadena de la polimerasa. Técnica que permite la amplificación específica de una secuencia de ADN en una muestra compleja.

**Polimorfismo**: presencia de más de un alelo para un *locus* dado en la población. Se da en una frecuencia de al menos un 1% entre los individuos de una población.

**Primers** (Cebadores): secuencia corta de oligonucleótidos que se une de forma específica a una cadena sencilla de ácido nucleico e inicia la síntesis de la cadena complementaria en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos.

**Splicing**: Proceso por el que un intrón es escindido y los exones religados durante las modificaciones postranscripcionales del ARNm.

**Tag SNP**: es un SNP representativo en una región del genoma con alto desequilibrio de ligamiento. Mediante su utilización es posible identificar variaciones genéticas sin genotipar todos los SNPs de una región cromosómica.

**Traducción**: Síntesis de una cadena proteica a partir de la información contenida en el ARNm.

**Transcripción**: Proceso de copiado de ADN para producir ARN.