

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI



“COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ISM1 Y
METRNL EN PIEL SANA Y EN ENFERMEDADES DE LA PIEL”

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Salud

PRESENTA:

Cynthia Martínez Reyes

DIRECTOR DE TESIS:

Octavio M. Robinson Navarro

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Albert Zlotnik

ASESOR:

Bernhard Homey

Mexicali B.C. México, mayo de 2013.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

DRA. JULIA DOLORES ESTRADA GUZMÁN
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI, UABC
PRESENTE.-

En mi carácter de director de tesis de Cynthia Martínez Reyes, alumna del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud, me permito informar a usted que después de dar seguimiento a las observaciones que los sinodales realizaron, he revisado la versión final de su tesis y no tengo inconveniente alguno en que continúen los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Mexicali, Baja California, a 6 de mayo de 2013.

ATENTAMENTE



Dr. Octavio M. Robinson Navarro
Profesor-investigador del Programa de
Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

C.c.p. M.C. Carmen Gorety Soria Rodríguez, Coordinadora de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Mexicali.

C.c.p. Cynthia Martínez Reyes.

C.c.p. Archivo.



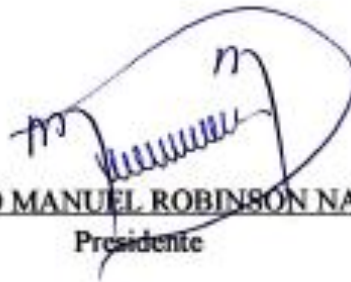
Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

**CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACIÓN DEL DOCUMENTO DE TESIS
PARA SUSTENTAR EL EXAMEN DE GRADO**

Mexicali, B.C. a, 6 de mayo de 2013.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: "COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ISM1 Y METRNL EN PIEL SANA Y EN ENFERMEDADES DE LA PIEL", que para obtener el GRADO de DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD presenta: LA C. CYNTHIA MARTÍNEZ REYES.

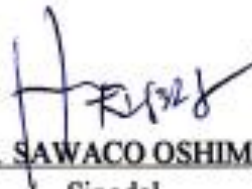
Realizada la evaluación resolvimos: APROBARLA.



DR. OCTAVIO MANUEL ROBINSON NAVARRO
Presidente



DR. ALBERT ZLOTNIK ESPINOZA
Sinodal



DRA. SAWAKO OSHIMA
Sinodal



DRA. MARÍA ELENA PACHECO SÁNCHEZ
Sinodal



DR. RAÚL DÍAZ MOLINA
Secretario

Agradecimientos.

A Alemania, por recibirme y acogerme con toda su belleza y grandeza.

A su gente, que es gente buena. A todos ellos los llevaré por siempre en mi corazón.

A su clima, su otoño por permitirme observar el caer de las hojas de sus árboles rojos y dorados, su invierno por deslizar nieve en mi cuerpo, su primavera por florecer sin retardo cada 21 de marzo, y a su verano por darme su calor de hogar.

A México, por permitirme salir de él a conocer otras culturas y al mismo tiempo dejarme abiertas sus puertas para siempre poder regresar. Que la paz un día sea lo único que prevalezca en él.

A la UABC, a quien considero la mejor universidad del mundo. Ser parte de ella es para mí un gran privilegio y un orgullo inmenso.

A la Facultad de Medicina, Mexicali, por su apoyo incondicional, a la que honro, quiero y respeto desde aquél agosto del año 2002 que ingresé como estudiante de medicina.

A los doctores y doctoras que integran el Comité de Posgrado de la Facultad de Medicina, Mexicali, porque su presencia en mi vida es una gran bendición; a todos ustedes mi eterna gratitud y sincero amor.

A los pacientes, por quienes el médico existe, cuyo dolor y vida me inspiran a ser más humana cada día.

A Dios, porque al ser solo Él quien comprende el misterio de la vida, somos capaces de hacer preguntas, de buscar respuestas y de explorar la vida. *Puedas Tu iluminar nuestros intelectos y abrir nuestros corazones para bien y servicio de la humanidad.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

RESUMEN.	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.	1
1.1. Antecedentes históricos.	1
1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).	2
1.3. Proyecto Genoma Humano (PGH).	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.	5
2.1. Microarreglos de ADN.	5
2.2. Índice Corporal de Expresión Génica (BIGE).	6
2.3. Perfil de expresión del gen ISM1 en el BIGE.	7
2.4. Características del gen ISM1.	9
2.5. Perfil de expresión del gen METRNL en el BIGE.	9
2.6. Características del gen METRNL.	11
2.7. Importancia del estudio de enfermedades de la piel.	12
2.8. Características de las enfermedades de piel incluidas en este trabajo.	12
2.8.1. Dermatitis atópica.	12
2.8.2. Psoriasis.	13
2.8.3. Prúrigo nodular.	15
2.8.4. Escleroderma.	16
2.8.5. Lupus eritematoso.	18
2.8.6. Liquen plano.	20
2.8.7. Queratosis actínica.	21
2.8.8. Carcinoma basocelular.	22
2.8.9. Carcinoma epidermoide.	23
2.8.10. Micosis fungoide.	24
2.8.11. Condiloma acuminado.	25
2.9. Planteamiento del Problema.	27
2.9.1. Pregunta de Investigación.	27
2.10. Justificación.	27

2.11. Objetivos.	28
2.11.1. Objetivo General.	28
2.11.2. Objetivos Específicos.	28
2.12. Hipótesis.	28
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
3.1. Diseño del estudio.	29
3.2. Selección de los pacientes.	29
3.2.1. Criterios de inclusión.	29
3.2.2. Criterios de exclusión.	29
3.3. Población y muestra.	29
3.4. Instrumentos y procedimientos.	30
3.4.1. Obtención de la biopsia.	30
3.4.2. Procesamiento de las biopsias.	30
3.4.2.1. Homogeneización del tejido.	31
3.4.2.2. Aislamiento de ARN total.	31
3.4.2.3. Cuantificación de ARN total.	32
3.4.2.4. Síntesis de ADNc.	32
3.4.2.5. RCP-c.	34
3.5. Variables.	36
3.5.1. Independiente.	36
3.5.2. Dependiente.	36
3.6. Plan de Análisis.	37
3.7. Aspectos Éticos, Normativos y de Seguridad.	37
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.	38
4.1. Enfermedades inflamatorias.	38
4.1.1. Dermatitis atópica.	38
4.1.2. Psoriasis.	39
4.1.3. Prúrigo nodular.	40
4.1.4. Escleroderma.	41

4.1.5. Lupus eritematoso.	42
4.1.6. Liqueen plano.	43
4.2. Enfermedades neoplásicas.	44
4.2.1. Queratosis actínica.	44
4.2.2. Carcinoma basocelular.	45
4.2.3. Carcinoma epidermoide.	46
4.2.4. Micosis fungoide.	47
4.3. Enfermedades infecciosas.	48
4.3.1. Condiloma acuminado.	48
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	51
5.1. Discusión.	51
5.1.1. Enfermedades inflamatorias.	51
5.1.2. Enfermedades neoplásicas.	54
5.1.3. Enfermedades infecciosas.	55
5.2. Conclusiones.	56
Referencias.	57
Anexos.	69
Anexo 1. Lista de abreviaturas.	69
Anexo 2. Carta de consentimiento informado.	71
Anexo 3. Técnica de aislamiento de ARN total.	72
Anexo 4. Técnica de cuantificación de ARN total.	74
Anexo 5. Técnica de síntesis de ADNc.	75
Anexo 6. Técnica de RCP-c.	77

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sitios de mayor expresión del gen ISM1 en el BIGE.	8
Tabla 2. Sitios de mayor expresión del gen METRNL en el BIGE.	10
Tabla 3. Tipos de psoriasis y principales características.	14
Tabla 4. Clasificación de escleroderma y principales características.	17
Tabla 5. Clasificación de lupus eritematoso y principales características.	19
Tabla 6. Factores de riesgo implicados en la patogénesis del carcinoma basocelular.	22
Tabla 7. Muestras de enfermedades de piel incluidas y controles sanos.	30
Tabla 8. Secuencias de los cebadores de los genes ISM1 y METRNL.	36
Tabla 9. Resultados de la expresión del gen ISM1 en las enfermedades de piel estudiadas.	49
Tabla 10. Resultados de la expresión del gen y METRNL en las enfermedades de piel estudiadas.	50

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Dogma central de la biología molecular.	1
Figura 2. RCP punto final desarrollada por Kary B. Mullis en 1986.	3
Figura 3. Diagrama del procedimiento de un microarreglo de ADN.	5
Figura 4. Perfil de expresión génica del gen calicreína 3 (KLK3) en el BIGE.	7
Figura 5. Perfil de expresión del gen ISM1 en el BIGE.	8
Figura 6. Perfil de expresión del gen METRNL en el BIGE.	10
Figura 7. Dermatitis atópica.	13
Figura 8. Psoriasis.	15
Figura 9. Prúrigo nodular.	16
Figura 10. Escleroderma localizada.	18
Figura 11. Lupus eritematoso cutáneo.	20
Figura 12. Liquen plano.	21
Figura 13. Queratosis actínica.	22
Figura 14. Carcinoma basocelular.	23
Figura 15. Carcinoma epidermoide.	24
Figura 16. Micosis fungoide.	25
Figura 17. Condiloma acuminado.	26
Figura 18. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en dermatitis atópica.	38
Figura 19. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en psoriasis.	39
Figura 20. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en prúrigo nodular.	40
Figura 21. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en escleroderma.	41
Figura 22. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en lupus eritematoso.	42
Figura 23. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en liquen plano.	43
Figura 24. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en queratosis actínica.	44
Figura 25. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en carcinoma basocelular.	45
Figura 26. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en carcinoma epidermoide.	46

Figura 27. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en micosis fungoide.	47
Figura 28. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en condiloma acuminado.	48

RESUMEN.

Introducción: La función de la mayor parte del genoma humano está pobremente caracterizada. El Dr. Zlotnik y colaboradores desarrollaron una base de datos llamada Índice Corporal de Expresión Génica o BIGE (por sus siglas en inglés, *Body Index of Gene Expression*) que permitió analizar la expresión de los genes de 105 tejidos humanos, incluyendo dos genes de piel y sistema inmune con mínima caracterización, *isthmin 1* (ISM1) y *meteorin-like* (METRNL), los cuales codifican para proteínas de secreción.

Objetivo: Comparar la expresión de los genes ISM1 y METRNL en piel sana con la expresión de estos genes en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel.

Materiales y métodos: Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RCP-c) para medir la expresión de los genes ISM1 y METRNL en muestras de piel de individuos sanos y de pacientes con: dermatitis atópica, psoriasis, prurigo nodular, escleroderma, lupus eritematoso, liquen plano, queratosis actínica, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, micosis fungoide y condiloma acuminado.

Resultados: El gen ISM1 presentó mayor expresión en dermatitis atópica (P de 0.036) y menor en condiloma acuminado (P menor que 0.0001). El gen METRNL mostró mayor expresión en dermatitis atópica (P de 0.034), psoriasis (P de 0.001), prurigo nodular (P de 0.045) y queratosis actínica (P de 0.017).

Conclusiones: Se observó la expresión del gen ISM1 aumentada en dermatitis atópica y disminuida en condiloma acuminado con significancia estadística. Por otro lado, el gen METRNL incrementó su expresión significativamente en dermatitis atópica, psoriasis, prurigo nodular y queratosis actínica. La expresión aumentada de los dos genes simultáneamente sólo se observó en dermatitis atópica.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.

1.1. Antecedentes históricos.

El estudio de la genética inició en el año de 1856 cuando Gregorio Mendel realizó su investigación en hibridación vegetal con distintas variedades de la planta *Pisum sativum* (guisante). Su trabajo le permitió publicar en 1866 las leyes de Mendel o leyes de la herencia¹, que aunque ignoradas por más de 30 años, hoy en día forman las reglas básicas sobre la transmisión de las características de los organismos de padres a hijos y constituyen el fundamento de la genética. Gregorio Mendel llamó factores a las unidades básicas de la herencia y fue en 1909 que Wilhelm Ludwig Johannsen a partir de la palabra griega *γένος* que significa "generar" le asignó el término gen a la unidad física y funcional de la herencia biológica².

A mediados del siglo XX, surgió el concepto de gen como la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que dirige la síntesis de una proteína³, y en 1953 James Watson y Francis Crick propusieron la estructura del ADN como dos hebras complementarias, que transcurrían en direcciones opuestas formando una doble hélice⁴. Adicionalmente, Francis Crick describió en 1970 un concepto al que denominó “el dogma central de la biología molecular”⁵, en el que propuso que los mecanismos de transmisión y expresión de la información contenida en los genes de una célula, acontecían invariablemente en el siguiente orden: el ADN se duplicaba en un proceso llamado replicación, posteriormente el ADN era transcrito a ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en un proceso llamado transcripción y finalmente el ARNm se traducía a proteína, en un proceso denominado traducción (figura 1).



Figura 1. Dogma central de la biología molecular. En 1970 se propuso que la información genética se transmitía de ADN a ARNm y de ARNm a proteína. (Esquema de Francis Crick)⁵.

Actualmente existe evidencia de que el flujo de la información genética no siempre acontece en la manera descrita por Francis Crick^{6,7}, sin embargo la descripción del “dogma” hace más de 40 años dio a la ciencia y al mundo entero una nueva visión para intentar comprender la existencia de la vida.

No obstante lo anterior, la investigación biomédica evolucionó no sólo a través del conocimiento, sino también a partir del desarrollo de nuevas tecnologías. A finales de la década de 1980 se hicieron grandes progresos en el área de la biología molecular: nació la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)^{8,9}, se automatizó la técnica de secuenciación de ADN^{10,11} y se debatió el comienzo del Proyecto Genoma Humano (PGH)^{12,13}. En el Reino Unido, Edwin Southern encontró la manera de usar la técnica de impresión a chorro empleada en las impresoras, utilizando en lugar de los cuatro colores básicos, cuatro nucleótidos para sintetizar secuencias oligonucleotídicas en laminillas de vidrio¹⁴. Al mismo tiempo, Stephen Fodor, en Estados Unidos, utilizó la técnica de tinción usada en fotopoligrafía con el mismo propósito¹⁵. Por su parte Patrick Brown propuso el uso de pequeñas secuencias de ADN pre-sintetizadas, en lugar de sintetizarlas en laminillas. Utilizando esta variante y en asociación con Mark Schena publicaron el primer estudio de expresión de un genoma completo y acuñaron la palabra ‘microarreglo’ (*microarray* en inglés)¹⁶.

La RCP junto a los microarreglos son hoy en día modernos procedimientos utilizados para el estudio de la expresión génica.

1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La técnica de la RCP la desarrolló Kary B. Mullis en 1986 y permitió de una manera simple la replicación de millones de copias de una muestra pequeña de ADN^{8,9}. De esta manera es posible amplificar un fragmento de ADN de interés, lo que tiene utilidad en múltiples áreas, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades, en la identificación de personas, así como también en la realización de investigación científica. Para lograr la amplificación, se emplean de 30 a 40 ciclos, conformados cada uno de tres pasos: el primero es la desnaturalización, que se realiza a una temperatura de 94°C, durante un minuto y consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN. El segundo paso es la alineación, se

realiza a una temperatura entre 50 y 60°C, durante 30-60 segundos y consiste en la hibridación de los cebadores con las cadenas desnaturalizadas del ADN. El tercer paso es la elongación, se efectúa a 72°C, durante 1-7 minutos, y consiste en la extensión de la longitud de los cebadores a través de la acción de la ADN polimerasa (figura 2.A-B). En la técnica desarrollada por Mullis (actualmente identificada como RCP punto final) posterior a la amplificación, es necesario colocar el ADN amplificado en un gel de agarosa, realizar corrimiento electroforético, tinción y observación con luz ultravioleta (LUV) (figura 2.C).

Finalmente, lo que se determina con la RCP es la cantidad de ADN complementario (ADNc) o el ARNm correspondiente de una muestra específica.

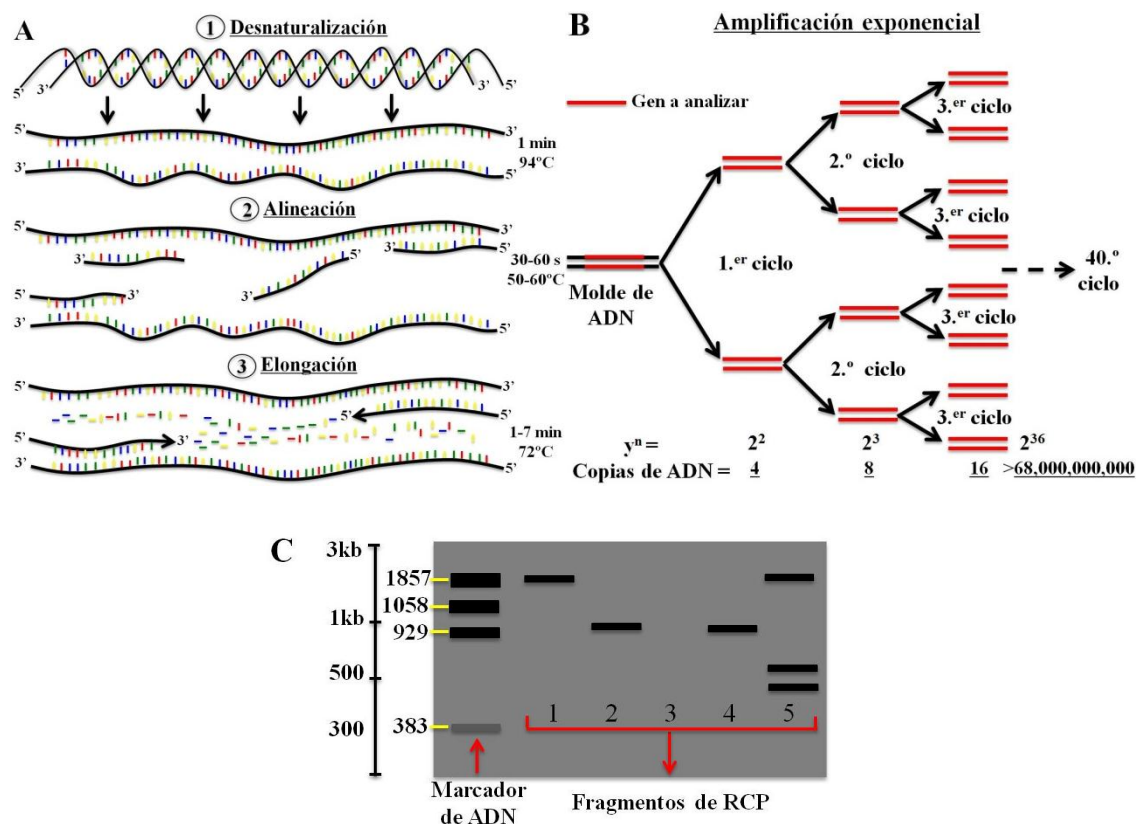


Figura 2. RCP punto final desarrollada por Kary B. Mullis en 1986. Tres pasos principales de la RCP punto final. (Esquemas de Andy Vierstraete)¹⁷.

No obstante lo anterior, la tecnología de la RCP evolucionó y en 1993 Russell Higuchi describió un sistema que permite la amplificación y cuantificación simultánea de un gen, a lo que llamó: RCP cuantitativa (RCP-c)¹⁸. La cuantificación puede ser en número absoluto

de copias o en cantidad relativa cuando se normaliza el gen de interés con un gen control o “*housekeeping gene*”. Algunos ejemplos de genes controles utilizados son el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el gen del ácido ribonucleico ribosomal 18S (ARNr 18S).

El método descrito por Higuchi se basa en la utilización de bromuro de etidio que se intercala entre las dos cadenas del ADN amplificado y se detecta mediante un termociclador que permite el envío de la señal fluorescente a un computador. La señal se incrementa de manera exponencial de la misma manera que se van amplificando las cadenas de ADN. Actualmente el agente intercalante más utilizado es SYBR Green, fácil de optimizar, económico y a diferencia del bromuro de etidio, no es cancerígeno.

Otra forma de detección es a través de sondas específicas, las cuales consisten en oligonucleótidos marcados con dos fluorocromos, uno que emite la señal y otro que la neutraliza; los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento del ADN de interés, y se unen a éste. Durante la amplificación, la ADN polimerasa hidroliza a los oligonucleótidos, los fluorocromos son separados, se deja de neutralizar la señal y el equipo es capaz de detectarla.

1.3. Proyecto Genoma Humano (PGH).

El PGH fue una colaboración internacional de una duración de 13 años (1990-2003), que permitió la secuenciación completa del genoma humano. De acuerdo a lo anterior el ADN humano contiene aproximadamente 3,100,000,000 pares de bases y alrededor de 23,000 genes distintos¹⁹⁻²¹.

El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano vino a revolucionar los estudios de biomedicina y genética clínica y permitió, la asociación de genes específicos con enfermedades poco comprendidas, aceleró el desarrollo de nuevas medicinas, y mejoró los diagnósticos moleculares. La prioridad actual de la comunidad científica es caracterizar y definir las funciones de los genes en salud y enfermedad²¹.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

Expresión génica es el término utilizado para describir la transmisión del material genético contenido en el ADN, transcrito a ARNm, y traducido a proteínas. Con pocas excepciones, cada célula del cuerpo humano contiene el número completo de cromosomas y genes idénticos. Sin embargo, sólo una fracción de estos genes se activa, y son los genes expresados los que finalmente confieren las propiedades y características únicas para cada tipo celular. La expresión correcta y armoniosa de los genes es fundamental para el crecimiento y desarrollo normal de una célula y son las interrupciones o cambios en la expresión génica que causan una gran cantidad de enfermedades humanas²². El estudio de los tipos y cantidades de ARNm producidos por una célula ayuda a comprender qué genes se expresan en esa célula y proporciona información sobre cómo la célula responde a sus necesidades cambiantes.

2.1. Microarreglos de ADN.

Los microarreglos de ADN son una técnica utilizada para la detección de moléculas de ARNm producidos en una célula, y permiten analizar simultáneamente la expresión de miles de genes o la totalidad de genes que componen el genoma de un organismo²²⁻²⁴. Los perfiles de expresión génica se pueden estudiar en condiciones fisiológicas, mediante el análisis de la expresión de los genes en tejidos sanos, o en condiciones patológicas, comparando los niveles de expresión entre genes obtenidos de tejidos patológicos y de tejidos sanos (figura 3), con el objetivo de identificar los genes implicados²⁵⁻²⁷.

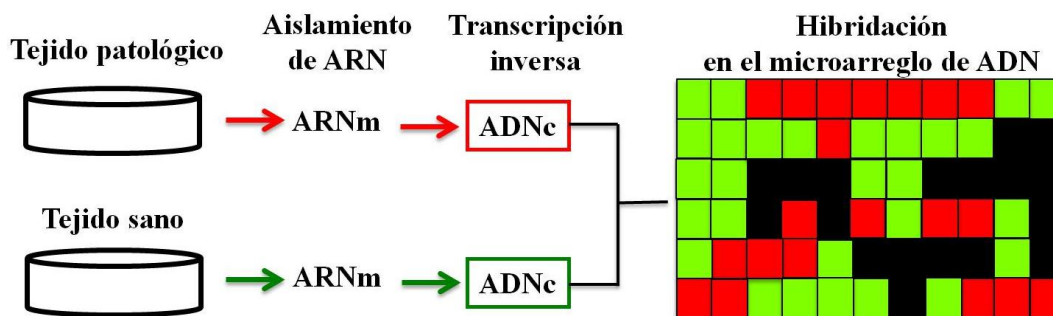


Figura 3. Diagrama del procedimiento de un microarreglo de ADN.

Por ejemplo, en un estudio de cáncer de cerebro, se utilizaron microarreglos de ADN (Affymetrix U95Av2) para analizar la expresión de aproximadamente 10,000 genes en 35 muestras de gliomas de diferente tipo y grado patológico (astrocitoma de bajo grado, oligodendroglioma y glioblastoma), así como en 7 muestras de cerebro normal. Los resultados indicaron que los gliomas estudiados se pueden distinguir fácilmente unos de otros y del cerebro normal por 170 genes²⁸.

En el campo de la endocrinología los microarreglos de ADN se emplearon en el estudio de obesidad y diabetes mellitus tipo 2^{29,30} y en enfermedades cutáneas, en melanoma, psoriasis, dermatitis atópica, entre otras³¹.

2.2. Índice Corporal de Expresión Génica (BIGE).

Con el fin de conocer la expresión de cada gen en el cuerpo humano, el Dr. Albert Zlotnik y colaboradores (Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de California, Irvine, USA.) construyeron una base de datos que llamaron: Índice Corporal de Expresión Génica o BIGE (por sus siglas en inglés, *Body Index of Gene Expression*), que les permitió analizar la expresión de cada uno de los aproximadamente 23,000 genes en 105 diferentes tejidos del cuerpo humano.

Esta base de datos se construyó purificando el ARNm de tejidos de 8 personas sanas que fallecieron accidentalmente (4 hombres y 4 mujeres). El ARNm obtenido se utilizó para sintetizar ADNc y finalmente se analizó por un sistema de microarreglos de ADN que contenía la totalidad de genes que componen al genoma humano (Affymetrix U133 2.0)^{32,33}. Los tejidos estudiados en el BIGE, fueron representativos de todos los sistemas que componen al cuerpo humano: sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), sistema gastrointestinal, urinario, reproductor, inmune, respiratorio, endocrino, muscular y vascular.

De esta manera, aquellos genes que exhiben alta expresión en un órgano o tejido en particular, son candidatos interesantes para ser estudiados en ese órgano en condiciones fisiológicas y patológicas. Por ejemplo, en la figura 4 se muestra el perfil de expresión del gen calicreína 3 (KLK3) que codifica para una glicoproteína de 34 kDa mejor conocida

como antígeno prostático específico (APE), por su alta expresión en próstata y su valiosa utilidad en el diagnóstico de enfermedades prostáticas³⁴.



Figura 4. Perfil de expresión génica del gen calicreína 3 (KLK3) en el BIGE. Affymetrix de microarreglos de ADN muestran valores normalizados por promedio de multichip robusto (RMA) de la expresión del gen KLK3 en 105 tejidos del cuerpo humano. U: uretra, Pr: próstata, B: bazo, CF: cerebro fetal. (Con autorización de Albert Zlotnik, Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de California, Irvine, USA).

Durante el análisis del BIGE, se identificaron dos genes altamente expresados en piel y en sistema inmune, isthmin 1 (ISM1) y meteorin-like (METRNL).

2.3. Perfil de expresión del gen ISM1 en el BIGE.

El perfil de expresión del gen ISM1 en el BIGE, se muestra en la figura 5 y tabla 1. De 105 tejidos humanos analizados, el pericardio fue el sitio de mayor expresión de ISM1, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas ocuparon el quinto lugar de mayor expresión, la piel se observó en el octavo lugar mientras que los linfocitos T CD4⁺ activados se localizaron en el noveno lugar.

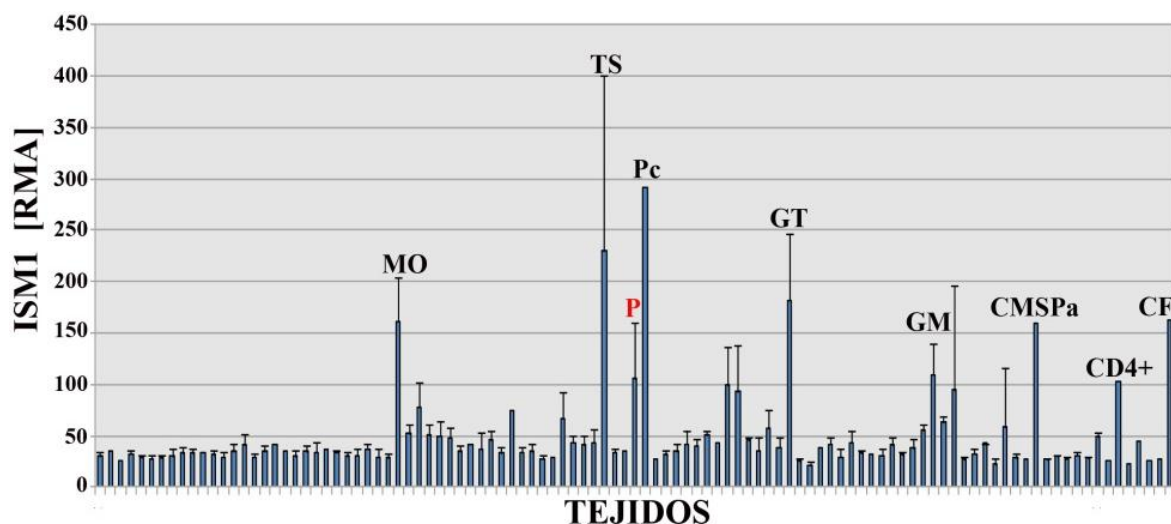


Figura 5. Perfil de expresión del gen ISM1 en el BIGE. Affymetrix de microarreglos de ADN muestran valores normalizados por promedio de multichip robusto (RMA) de la expresión del gen ISM1 en 105 tejidos del cuerpo humano. MO: mucosa oral, TS: tejido sinovial, P: piel, Pc: pericardio, GT: glándula tiroides, GM: glándula mamaria, CMSPa: células mononucleares de sangre periférica activadas, CD4⁺: linfocitos T CD4⁺ activados, CF: cerebro fetal. (Con autorización de Albert Zlotnik, Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de California, Irvine, USA).

Tabla 1. Sitios de mayor expresión del gen ISM1 en el BIGE.

Orden	Sitio	Expresión relativa
1	Pericardio	292
2	Tejido sinovial	229
3	Glándula tiroides	182
4	Cerebro fetal	162
5	Mucosa oral	162
6	CMSP activadas	159
7	Glándula mamaria	110
8	Piel	105
9	Linfocitos T CD4 ⁺ activados	103
10	Tráquea	99

2.4. Características del gen ISM1.

El gen ISM1 se localizó en el brazo corto del cromosoma humano 20 (20p12.1). Inicialmente, se identificó por su alta expresión en el cerebro de *Xenopus*, en una región llamada istmo, motivo por el cual se le asignó el nombre de isthmin³⁵; posteriormente se encontraron otros genes pertenecientes a la misma familia por lo que a isthmin se le designó como isthmin 1 (ISM1) o simplemente como isthmin (ISM).

No obstante lo anterior, de acuerdo al análisis del BIGE, ISM1 presentó nula o mínima expresión en SNC de humanos, a diferencia de la alta expresión que mostró en el cerebro de *Xenopus*.

El gen ISM1 codifica para una proteína de secreción de aproximadamente 60 kDa que contiene en su estructura un péptido señal de 29 aminoácidos, un dominio trombospondina tipo 1 (TSP1) localizado en el centro de la proteína y un dominio de adhesión asociado en MUC4 y otras proteínas (AMOP, del inglés adhesion-associated domain in MUC4 and other proteins) el cual se localiza en la región C-terminal de la proteína³⁵.

El dominio TSP1 forma parte de la estructura de proteínas inhibidoras de la angiogénesis³⁶. Por otro lado, el dominio AMOP está presente en proteínas antagonistas de la agregación plaquetaria, en proteínas de secreción involucradas en el sistema inmune y se observó su participación en mecanismos de adhesión celular³⁷. Por motivo de su estructura, los trabajos previos centraron su investigación en los efectos antiangiogénicos de ISM1³⁸⁻⁴⁰.

2.5. Perfil de expresión del gen METRNL en el BIGE.

El perfil de expresión del gen METRNL en el BIGE se muestra en la figura 6 y tabla 2. De 105 tejidos humanos analizados, la expresión más alta de este gen fue en monocitos activados, seguidos de CMSP activadas, mucosa oral, mucosa faríngea y piel en el quinto lugar.

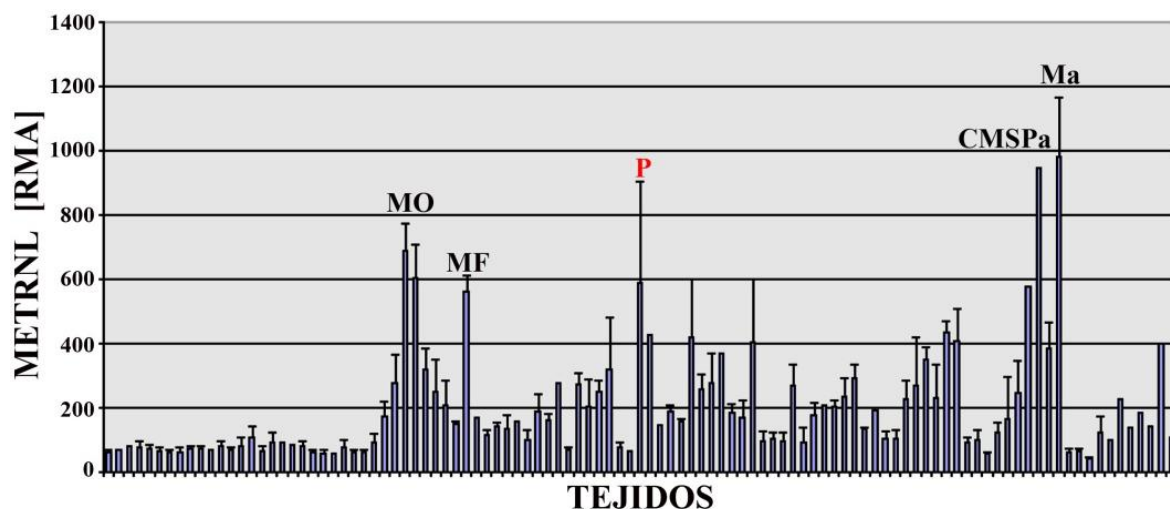


Figura 6. Perfil de expresión del gen METRNL en el BIGE. Affymetrix de microarreglos de ADN muestran valores normalizados por promedio de multichip robusto (RMA) de la expresión del gen METRNL en 105 tejidos del cuerpo humano. MO: mucosa oral, MF: mucosa faríngea, P: piel, CMSPa: células mononucleares de sangre periférica activadas, Ma: monocitos activados. (Con autorización de Albert Zlotnik, Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de California, Irvine, USA).

Tabla 2. Sitios de mayor expresión del gen METRNL en el BIGE.

Orden	Sitio	Expresión relativa
1	Monocitos activados	981
2	CMSP activadas	947
3	Mucosa oral	690
4	Mucosa faríngea	604
5	Piel	589
6	CMSP	579
7	Esófago	564
8	Pezón	436
9	Pericardio	429
10	Aorta	419

2.6. Características del gen METRNL.

El gen METRNL se localizó en el brazo largo del cromosoma humano 17 (17q25.3). Codifica para una proteína de secreción de un peso molecular de aproximadamente 29 kDa y posee un péptido señal de 45 aminoácidos. Se le asignó el nombre de METRNL debido a que su estructura es similar a la proteína meteorin (METRN), de ahí el nombre de *meteorin-like* ('semejante a meteorin'). METRN es un factor de crecimiento neurotrófico y su homología con METRNL es de aproximadamente 40%⁴¹. La descripción de METRNL en la literatura es mínima, existen 2 publicaciones acerca de este gen. Por una parte, se estudiaron a pacientes con amiloidosis cutánea localizada primaria familiar o FPLCA (*familial primary localized cutaneous amyloidosis*), la cual es una enfermedad que se hereda de modo autosómico dominante, caracterizada por prurito crónico y licuefacción de la piel. La expresión del genoma humano completo se analizó a través de microarreglos de ADN en 6 muestras de lesiones de piel de pacientes con FPLCA y en 6 muestras de piel sana (grupo control)⁴². Los resultados mostraron una mayor expresión del gen METRNL en FPLCA excediendo 2.14 veces a la expresión observada en piel sana. Estos datos se comprobaron a través de RCP-c donde se evidenció la mayor expresión del gen METRNL en lesiones de piel de pacientes con esta enfermedad.

Por otro lado, se buscaron genes involucrados en la transducción de señales durante el "proceso latente" en el cual las neuronas se preparan para la maduración y extensión de procesos neuronales (neuritas). Se encontraron 3 genes, *Metrl*, *Dclk1* y *Serpinb1a*, cuya expresión se indujo de manera transitoria en estas células⁴³. Además, se observó que la neutralización de cualquiera de estos genes usando ARN de interferencia (ARNi) inhibió la formación de neuritas después del 'proceso latente'. Estos resultados indicaron que estos genes participaron en la diferenciación de las células y en la preparación que éstas requieren para completar sus funciones celulares. El hecho que *Metrl* codifique para una proteína de secreción sugiere que podría influir en la función de células vecinas para activar sus funciones una vez terminado el proceso latente.

2.7. Importancia del estudio de enfermedades de la piel.

La piel, con aproximadamente 2 m² de superficie, 5 kg de peso y un espesor de 0.5 a 4 mm, representa el órgano más grande del cuerpo humano. Es un órgano complejo que actúa como barrera entre el medio interno y externo para la protección contra agresiones físicas, químicas y microbiológicas; además es órgano de percepción, termorregulación y evaporación.

Por otra parte, la piel es una fuente importante de mediadores, como citocinas proinflamatorias, prostaglandinas, leucotrienos, péptidos antimicrobianos y neuropéptidos, funcionando de esta manera como un órgano inmunológico. Sin embargo, estos mecanismos que normalmente son encaminados para mantener la homeostasis, pueden ocasionar una alta reactividad inmunológica, lo que resulta en enfermedades como psoriasis, lupus eritematoso, dermatitis atópica, escleroderma, entre otras⁴⁴.

2.8. Características de las enfermedades de piel incluidas en este trabajo.

2.8.1. Dermatitis atópica.

La dermatitis atópica, también conocida como eczema atópico, es una dermatosis crónica recidivante, inflamatoria, caracterizada por xerosis y prurito. Su prevalencia es del 1 al 3% en adultos y del 10 al 20% en niños⁴⁵.

La distribución de las lesiones varía según la edad. Los infantes tienden a tener lesiones en las mejillas y cuero cabelludo, los niños en las mejillas, extremidades, la frente y el cuello, mientras que los adultos en la cabeza, el cuello y zonas de flexión, como las fosas antecubital y poplítea. En ocasiones la enfermedad se observa en todo el tegumento. Las lesiones agudas comienzan como pápulas eritematosas y exudados serosos. Las lesiones secundarias incluyen excoriaciones, costras y erosiones debidas a rascado. Las lesiones subagudas aparecen como pápulas y/o placas eritematosas, descamativas⁴⁶.

Su etiología es multifactorial, participan una predisposición genética e importantes mecanismos inmunológicos como son las reacciones de hipersensibilidad a antígenos variados (alimentos, neumoalergenos y proteínas bacterianas) y la infiltración de linfocitos T CD4⁺, que en las lesiones agudas de dermatitis atópica se diferencian predominantemente

al linaje Th2, con la liberación de citosinas proinflamatorias incluyendo la interleucina 4 (IL-4), IL-13, IL-31, mientras que en las lesiones crónicas se diferencian principalmente al linaje Th1, con la secreción de interferón gamma (IFN- γ) e IL-12⁴⁷.

Por otro lado, en los pacientes con dermatitis atópica existe un defecto en la función de barrera de la piel, que predispone a los pacientes a frecuentes infecciones cutáneas, causadas generalmente por *Staphylococcus aureus*⁴⁸.

El tratamiento de la dermatitis atópica se basa en el empleo de esteroides tópicos y/o sistémicos, antihistamínicos, e inhibidores de la calcineurina⁴⁹.



Figura 7. Dermatitis atópica. Lesiones eritematosas en dorso y cara posterior de extremidades superiores. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.2. Psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, crónica de la piel. Su prevalencia es del 2 al 3% en la población general representando una importante causa de morbilidad. Afecta por igual a ambos sexos, y puede iniciar a cualquier edad, aunque suele hacerlo entre los 15 y los 35 años. Existen distintas formas de presentación clínica, no obstante más del 90% de los casos corresponden a psoriasis vulgar, tabla 3⁵⁰⁻⁵².

La etiología de la psoriasis es desconocida. Sin embargo, existe una hiperplasia epidérmica resultado de una proliferación aberrante de queratinocitos, en la que contrario a la renovación normal de estas células cada 28-30 días, se realiza cada 3-5 días, lo que genera acumulación celular en la capa más superficial de la epidermis dando la apariencia de

escamas en las lesiones típicas de psoriasis. Por otra parte, se genera un proceso inflamatorio dérmico, mediado por una interacción entre monocitos, células dendríticas, linfocitos Th1 y Th17, que liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias, por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, entre otras^{53,54}.

Tabla 3. Tipos de psoriasis y principales características.

Tipo	Características
Vulgar	Es el tipo más común (90%). Se presenta en forma de placas eritematosas, simétricas, circunscritas, con bordes gruesos y bien delimitados. Las lesiones se observan recubiertas por abundantes escamas blancas nacaradas, imbricadas, y fácilmente desprendibles. Su localización es predominante en codos, rodillas, cuero cabelludo, y región lumbosacra.
Gutata	Se presenta con lesiones eritematosas en forma de "gotas" o pequeños puntos de 1 cm, con localización preferentemente en el tronco. Suele desarrollarse posterior a una infección estreptocócica de las vías respiratorias superiores.
Eritrodérmica	Lesiones eritematosas generalizadas comprometiendo más del 90% de la extensión corporal, presentando fiebre y leucocitosis.
Pustulosa	Variante aguda e infrecuente, se acompaña de síntomas sistémicos: fiebre, mal estado general y leucocitosis.
Intertriginosa	Afecta a los pliegues cutáneos, principalmente: axilares, genitocrurales (ingles), interglúteos y submamarios.
Artrítica	Representa el 7%, es más invalidante que la psoriasis estrictamente cutánea, afectando articulaciones de manos, muñecas, rodillas y tobillos.

Más del 70% de los pacientes con psoriasis pueden ser tratados con el uso de terapia tópica. Los análogos de la vitamina D3 (calcipotriol y tacalcitol) y el retinoide tópico tazarotene, se usan con mayor frecuencia a la antralina y el alquitrán de hulla. La mayoría de estas sustancias pueden causar irritación de la piel, por lo que, los corticosteroides tópicos se utilizan en combinación. En pacientes con psoriasis severa, el uso de fototerapia y/o fármacos sistémicos (ciclosporina, fumaratos, metotrexate, retinoides sistémicos) son recomendados^{52,55}.

Los tratamientos biológicos son una alternativa de terapia para la psoriasis. Las dos clases principales son agentes biológicos dirigidos a las células T y dirigidos a citocinas. Entre estos últimos se incluyen los fármacos inhibidores del FNT (infliximab, etanercept, adalimumab), el anticuerpo monoclonal anti-IL-12 e IL-23 (ustekinumab), el anticuerpo monoclonal anti-IL-17 (ixekizumab) y el anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de la IL-17 (brodalumab), todos los cuales han mostrado ser de gran eficacia en el tratamiento de esta enfermedad⁵⁶⁻⁵⁹.



Figura 8. Psoriasis. Lesiones eritemato-escamosas en codos, región lumbar y glúteos. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.3. Prurigo nodular.

El prurigo nodular es una neurodermatitis de curso crónico, etiología desconocida, que se caracteriza por la formación de pápulas y nódulos indurados e hiperqueratósicos de 1 a 3 cm de diámetro, localizados comúnmente -de forma simétrica y en número variable- en las superficies extensoras de las extremidades inferiores. El tronco puede estar involucrado, mientras que la cara y las manos son raramente afectadas. Su característica más significativa y constante es su naturaleza extraordinariamente pruriginosa. De hecho, esta enfermedad representa una condición dermatológica primaria o una manifestación dermatológica secundaria como consecuencia de una manipulación traumática repetida posterior al prurito crónico causado por otras enfermedades sistémicas⁶⁰.

En su patogénesis se implicó el factor de crecimiento nervioso (FCN), el péptido relacionado al gen de la calcitonina (PRGC) y los nervios inmunorreactivos a la sustancia P, los cuales se encontraron incrementados en las lesiones de prurigo nodular en comparación con la piel normal. Estos péptidos podrían ser los mediadores de la inflamación neurogénica cutánea y el prurito⁶¹.

El tratamiento de elección son los glucocorticoides tópicos o intralesionales, la vitamina D3 tópica y la capsaicina. Entre los tratamientos orales utilizados están los antihistamínicos, la ciclosporina y la talidomida⁶².



Figura 9. Prurigo nodular. Pápulas y nódulos indurados en cara anterior de ambas piernas. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.4. Escleroderma.

Escleroderma que significa “piel dura” es una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria del tejido conectivo difuso, de etiología desconocida, caracterizada por fibrosis en piel, vasos sanguíneos, músculos esqueléticos y órganos internos. Se divide en dos grupos: localizada, en la que solo existe fibrosis en piel y sistémica (llamada esclerosis sistémica), en la que piel y órganos internos presentan fibrosis, lo que tiene repercusiones clínicas severas que ocasionan daño a los sistemas cardiovascular y respiratorio, así como al tracto gastrointestinal, principalmente⁶³.

Su prevalencia es de 50 a 300 casos por millón de personas, su incidencia varía desde 2.3 a 22.8 casos por millón de personas por año y al igual que en la mayoría de enfermedades autoinmunes, las mujeres se ven más afectadas que los hombres en una relación de 4-14:1. El pico de incidencia de esta enfermedad se encuentra entre la tercera y quinta década.

Los pacientes con la variedad sistémica pueden presentar una cantidad importante de autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-nucleares, anti-topoisomerasa y anti-centrómero⁶⁴. La tabla 4 resume la clasificación de escleroderma y sus principales características⁶⁵⁻⁶⁸.

Tabla 4. Clasificación de escleroderma y principales características.

Tipo	Características
Localizada	Se le llama localizada porque solo hay fibrosis en la piel y no afecta a órganos internos. Se divide en morfea, lineal y golpe de sable.
Morfea	Forma más común del tipo localizada. Se presenta como parches de piel abultada con aumento o disminución de la pigmentación. Afecta solo a capas superficiales de la piel.
Lineal	Es una banda o línea de piel abultada. Puede afectar al tejido subcutáneo y músculo adyacente. Presentación en piernas y brazos. Más frecuente en niños y adolescentes.
Golpe de sable	Es la escleroderma lineal con localización en cara o cuero cabelludo. Ocasionalmente se asocia con anormalidades en el crecimiento de los huesos faciales, produciendo deformaciones considerables.
Sistémica	Se le llama sistémica porque hay fibrosis de piel y de órganos internos. Se clasifica en limitada y difusa, atendiendo a la distribución corporal del endurecimiento de la piel.
Limitada	El endurecimiento de la piel se limita a la cara y parte distal de extremidades (antebrazos, manos, pies y piernas). Otros signos y síntomas incluyen: calcinosis, fenómeno de Raynaud, telangiectasias, artritis. Afecta a órganos internos, esófago, pulmones, corazón, riñones, esófago.
Difusa	El endurecimiento de la piel afecta a cara, cuello, tórax, abdomen, parte distal y proximal de extremidades superiores e inferiores. Afecta con mayor severidad a órganos internos que la variedad limitada.



Figura 10. Escleroderma localizada. Endurecimiento de la piel en forma de lesiones circunscritas localizadas en abdomen. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.5. Lupus eritematoso.

Lupus eritematoso (LE) es una enfermedad que presenta un amplio espectro de manifestaciones cutáneas, sistémicas y que ha sido objeto de investigación durante más de 100 años. Se le asignó el nombre a esta enfermedad en el siglo XII porque la lesión de la piel se parecía a la mordedura de un lobo: "lupus" del latín que significa lobo y "eritematoso" que significa rojo. Su etiología es desconocida, sin embargo, la herencia, el medio ambiente, cambios hormonales y alteraciones en el sistema inmune tienen un papel importante en su patogénesis. Su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres (9:1) y su edad de inicio es por lo común entre los 20 y 40 años⁶⁹.

De manera general el lupus eritematoso se clasifica en tres tipos (tabla 5):

1. Lupus eritematoso cutáneo (LEC) o también llamado discoide (LED)
2. Lupus eritematoso sistémico (LES)
3. Lupus eritematoso inducido por medicamentos (LEIM).

Hay diferencias importantes en la severidad y presentación clínica de las tres clases de lupus, sin embargo las manifestaciones cutáneas se observan en las tres condiciones.

El LEC es limitado a la piel, principalmente de la cara, oídos, cuello y cuero cabelludo. Rara vez afecta órganos internos y los anticuerpos antinucleares por lo general son

negativos. Luego de varios años de evolución del padecimiento, aproximadamente el 10% de los pacientes desarrolla síntomas sistémicos⁶⁹.

El LES es el tipo más severo y afecta a cualquier órgano del cuerpo humano. Cursa con períodos de pocos o ningún síntoma y con épocas de gran actividad. Entre las manifestaciones clínicas se presentan: erupciones cutáneas, artritis, anemia, convulsiones. La afección al riñón, los pulmones y el corazón también es común. Una alta y variada producción de autoanticuerpos se encuentran en estos pacientes, incluyendo: anticuerpos anti-nucleares, anti-ADN, anti-ribonucleoproteínas, anti-fosfolípidos, anti-histonas, entre otros⁷⁰.

El LEIM ocurre luego del uso, por lo general prolongado, de algunos fármacos como la procainamida, hidralazina y quinidina⁷¹. En los últimos años, se asoció con el uso de fármacos anti-FNT⁷². Por lo general los síntomas son de menor severidad que en el LES y en la mayoría de los casos, hay remisión de la sintomatología al suspender el medicamento responsable.

Tabla 5. Clasificación de lupus eritematoso y principales características.

Tipo	Características
Cutáneo	Se caracteriza por manchas rojas, que aparecen sobre ambas mejillas y el puente de la nariz ("eritema en forma de mariposa"). Algunas de las lesiones dejan cicatrices y cambian la pigmentación de la piel, otras lesiones sanan sin dejar cicatriz. Estas manchas aparecen sobre todo en áreas expuestas al sol, acompañándose de fotosensibilidad y pérdida de cabello.
Sistémico	Afecta a cualquier órgano y sistema del cuerpo humano, es la variante más severa. Cursa con periodos de remisión y exacerbación. Entre las manifestaciones clínicas están: erupciones cutáneas, artritis, anemia, convulsiones, proteinuria y afección cardiovascular. Se desarrolla una importante producción de auto-anticuerpos incluyendo, anticuerpos anti-nucleares, anti-ADN, anti-ribonucleoproteínas, anti-fosfolípidos, anti-histonas, entre otros.
Inducido por medicamentos	Es resultado del uso de fármacos (procainamida, hidralazina y quinidina). Afecta cualquier órgano, aunque los síntomas no son severos, y remiten al suspender el medicamento responsable.



Figura 11. Lupus eritematoso cutáneo. Lesiones en forma de placas eritematosas en espalda superior. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.6. Liquen plano.

El liquen plano es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, crónica, de etiología desconocida, que afecta piel, mucosa oral, mucosa genital, cuero cabelludo y uñas. Su prevalencia se estima entre el 0.1 al 4% de la población general. La mayoría de los casos inician entre los 30 y 60 años de edad y afecta a las mujeres más que a los hombres en una relación 3:2⁷³.

Los elementos que describen a las lesiones o erupciones típicas de un liquen plano son las 5 p's: pápulas, placas, poligonales, pruríticas, pigmentadas. El inicio suele ser de carácter agudo, afectando a las superficies de flexión de las muñecas, los antebrazos y las piernas. Las lesiones son a menudo cubiertas por líneas reticulares, blanquecinas conocidas como estrías de Wickham. En la patogénesis del liquen plano la participación de un componente inmunitario mediado por células T es fundamental^{73,74}.

Los corticosteroides tópicos son la primera línea de tratamiento. Los corticosteroides sistémicos se utilizan en casos generalizados.

El liquen plano puede resolverse espontáneamente en uno o dos años, aunque las recidivas son frecuentes y la erupción tiende a sanar dejando una coloración en la piel azul negruzca o marrón⁷⁴.



Figura 12. Liquen plano. Pequeñas pápulas pigmentadas localizadas en región anterior-interna de antebrazos. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.7. Queratosis actínica.

La queratosis actínica es una enfermedad neoplásica de la piel causada por la exposición excesiva a la radiación con LUV. En los Estados Unidos de América representa la tercera causa más frecuente de consulta con dermatólogos. En Australia, la prevalencia se estimó en un 40-50% de la población mayor de 40 años⁷⁵.

Su frecuencia es mayor en hombres que en mujeres, los pacientes pueden tener lesiones únicas o múltiples, pero el número medio por persona es de seis a ocho lesiones. Estas lesiones son de crecimiento lento, pequeñas (menores a 1 cm de diámetro), ásperas, de color rosa, rojo o marrón. También se pueden presentar como pápulas eritematosas en placas grandes, con telangiectasias, cubiertas por escamas adherentes de color amarillo⁷⁵. Se desarrolla más comúnmente en las áreas expuestas al sol (cara, pabellones auriculares, cuello, manos, antebrazos).

La radiación con LUV causa cambios químicos en los queratinocitos, que histológicamente se evidencian como una proliferación y diferenciación anormal de estas células. La evolución de las lesiones puede seguir una de tres vías: regresión, persistir sin cambios, o evolucionar a carcinoma epidermoide en un 0.1 hasta un 20% de los casos^{76,77}.

Hay muchos tratamientos eficaces para la queratosis actínica, quirúrgicos (curetaje, electrocirugía, láser, criocirugía, dermoabrasión, extirpación quirúrgica) y farmacológicos

(fluorouracilo, imiquimod y diclofenaco tópicos). Sin embargo, evitar la exposición solar excesiva es la mejor prevención⁷⁸.

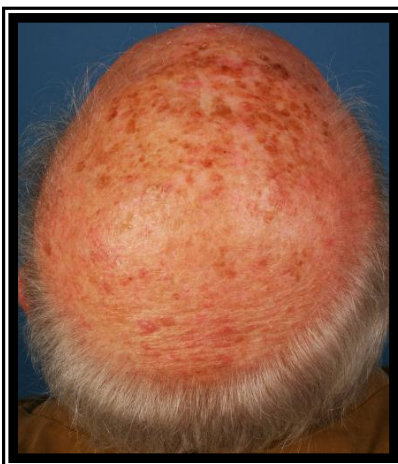


Figura 13. Queratosis actínica. Múltiples lesiones en forma de máculas eritematosas localizadas en áreas expuestas al sol. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.8. Carcinoma basocelular.

El carcinoma basocelular representa el 75% de los cánceres de piel. Recibe su nombre debido a que se origina de los queratinocitos localizados en la capa basal de la epidermis. Su etiología es multifactorial, participan factores extrínsecos e intrínsecos en su desarrollo, tabla 6. La radiación con LUV es responsable de la mayor parte del daño cutáneo y se le considera como el factor de riesgo principal para este cáncer. Otros factores de riesgo incluyen los carcinógenos químicos, como la ingestión de ácido arsénico e hidrocarburos, y la administración tópica de mostaza nitrogenada. Los factores intrínsecos (constitucionales) son el sexo, la edad y la predisposición genética⁷⁹.

Tabla 6. Factores de riesgo implicados en la patogénesis del carcinoma basocelular.

Extrínsecos	Intrínsecos
Radiación con LUV	Edad > 60 años
Inmunosupresión	Sexo masculino
Carcinógenos químicos	Piel tipo I
Radiación ocupacional y terapéutica	Historia familiar de carcinoma basocelular
Quemaduras	Enfermedades genéticas: xeroderma pigmentosa, albinismo

En base a criterios clínico-patológicos, el carcinoma basocelular se divide en subtipos, especificados como nodular y superficial. Los tipos nodular son más frecuentes en áreas de la cabeza expuestas al sol, mientras que los de tipo superficial ocurren con mayor frecuencia en el tronco⁸⁰.



Figura 14. Carcinoma basocelular. Nódulo único, perlado, con bordes eritematosos y superficie central ulcerada, localizado en cabeza. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

El tratamiento del carcinoma basocelular incluye resección quirúrgica, cirugía de Mohs, crioterapia, curetaje y electrodesecación; tratamientos médicos como el imiquimod y fluorouracilo son una opción, aunque menormente utilizados⁸¹.

2.8.9. Carcinoma epidermoide.

El carcinoma epidermoide es el segundo en frecuencia de los cánceres de piel, representando del 15 al 20% del total de los casos. Al igual que en el carcinoma basocelular, el factor de riesgo más importante en su desarrollo es la exposición a la radiación con LUV. Se origina de los queratinocitos, localizados en las capas más superficiales de la epidermis. Las lesiones aparecen como pápulas o placas firmes, color rosa, suaves e hiperqueratósicas, que pueden presentar ulceración. Crecen con mayor rapidez y son más invasivas que las lesiones del carcinoma basocelular⁸².

El riesgo de metástasis varía del 1 al 5%, sin embargo en algunas variedades puede ser de hasta un 40%. Las metástasis pueden diseminarse vía linfática (a ganglios linfáticos) o hematógica (a pulmones)⁸².

El uso apropiado de curetaje y electrodesecación o criocirugía puede eliminar hasta el 90% de los tumores que sean pequeños, localizados y con bajo riesgo de metástasis. La escisión quirúrgica y la cirugía de Mohs ofrecen menores tasas de recurrencia y de metástasis en pacientes con tumores de alto riesgo^{81,82}.



Figura 15. Carcinoma epidermoide. Tumoración nodular localizada en cabeza. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.10. Micosis fungoide.

El término micosis fungoide significa «enfermedad fúngica parecida a hongos», sin embargo, no es una infección fúngica, fue llamada así por el primer dermatólogo que la describió en 1806 y la observó en un caso grave de un paciente en el que las lesiones tenían aspecto de hongo⁸³.

La micosis fungoide es un trastorno progresivo, crónico y no contagioso de la piel que forma parte de los linfomas no-Hodgkin. Se caracteriza por una proliferación de células T CD4⁺ en piel y representa el tumor cutáneo más común de células T⁸⁴.

La causa de esta enfermedad no se conoce, sin embargo se sugirió como posible agente etiológico al virus linfotrópico T humano tipo 1 (VLTH-1)⁸⁵.

Es más frecuente en hombres que en mujeres (2:1) y su edad de inicio es entre los 55 y 60 años de edad. Los síntomas típicos incluyen lesiones tipo máculas o pápulas que pueden ser descamativas. El curso clínico de la micosis fungoide se desarrolla en tres etapas. La primera etapa es eritematosa caracterizada por una erupción localizada, que suele causar prurito. La segunda etapa se caracteriza por la presencia de manchas en forma de placas induradas, con bordes bien delimitados y ligeramente elevadas por encima del plano de la piel. Finalmente, en la tercera etapa aparecen lesiones tipo tumor o placas protuberantes y que pueden formar úlceras pequeñas⁸⁶.

El tratamiento incluye terapia tópica (mecloretamina, carmustina, esteroides y gel de bexaroteno), así como terapia sistémica (interferón, retinoides orales, bexaroteno, vorinostat y denileucina diftitox) para pacientes en etapas tardías⁸⁷.



Figura 16. Micosis fungoide. Lesiones múltiples en forma de pápulas uniformes, localizadas en dorso. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.8.11. Condiloma acuminado.

El condiloma acuminado, también llamado verrugas genitales, es una enfermedad de transmisión sexual altamente contagiosa, causada por el virus del papiloma humano (VPH). Hasta la fecha, se conocen más de 120 tipos diferentes del VPH, sin embargo los tipos 6 y 11 son responsables del 90% de los casos de condiloma acuminado⁸⁸.

Las lesiones son de color rosa o blanquecinas, planas o elevadas, blandas, solas o en racimos, preferentemente localizadas en zonas húmedas (genitales, región anal y mucosa oral).

El aumento de su incidencia en pacientes inmunosuprimidos en células T sugiere fuertemente que las respuestas de las células T $CD4^{+}$ y/o $CD8^{+}$ desempeñan un papel vital en el control de la infección del VPH. La naturaleza de estas respuestas inmunes y sus mecanismos aún no se entienden completamente, sin embargo se considera que en las lesiones de condiloma acuminado se instala una respuesta inmune que genera un infiltrado de linfocitos T $CD4^{+}$ en los queratinocitos, lo que da lugar a su vez a una respuesta celular de tipo Th1 que finalmente producirá interferones para revertir la infección viral⁸⁹.

Las opciones de tratamiento actualmente disponibles están en gran medida dirigidas a la eliminación del crecimiento verrugoso en lugar de a la eliminación de la infección viral subyacente. Ninguna terapia definitiva ha surgido como el estándar ideal y generalmente la selección se realiza de una manera específica dependiendo el paciente. Entre los medicamentos tópicos más utilizados se encuentran: la podofilina, el imiquimod y las sinecatequinas. Los tratamientos destructivos y quirúrgicos incluyen: el uso de ácido tricloroacético, la crioterapia, la electrocirugía y la escisión quirúrgica⁹⁰.



Figura 17. Condiloma acuminado. Lesiones múltiples, nodulares y de color rosado en región anal. (Cortesía del Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania).

2.9. Planteamiento del Problema.

Las patologías antes presentadas representan un importante problema de morbilidad a nivel mundial, muchas de ellas comparten características inflamatorias, tendencia a la cronicidad y desconocimiento de las causas que las originan. Por otra parte, no existe un completo entendimiento de la expresión de los genes de piel que acompañan a todas estas patologías. ISM1 y METRNL son genes recientemente descritos que se expresan en piel sana y en otros tejidos humanos como en el sistema inmune, lo que los hace candidatos a ser investigados en el contexto patológico de la piel para observar si muestran mayor o menor expresión en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel.

2.9.1. Pregunta de Investigación.

¿En qué magnitud se expresan los genes ISM1 y METRNL en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel?

2.10. Justificación.

Esta época ofrece una oportunidad única para implementar proyectos de investigación enfocados en estudiar genes nuevos de los cuales no existe información y de esta manera dilucidar su función y propiedades. El conocer la función de los genes aporta información sobre enfermedades poco comprendidas, permite el desarrollo de nuevas medicinas, y/o de diagnósticos más precisos.

Las causas que originan algunas patologías de la piel como psoriasis, dermatitis atópica y escleroderma, son una incógnita. Estas enfermedades tienen como denominador común cronicidad, inflamación y autoinmunidad^{47,50-54,63}. Por su parte, los procesos neoplásicos de la piel son un problema cada vez mayor a nivel mundial incluyendo México^{79,80,82,91}, y las infecciones cutáneas son parte de la práctica médica diaria⁹²⁻⁹⁷.

La tecnología molecular que existe actualmente, nos brinda una oportunidad sin precedente para estudiar dos genes (ISM1 y METRNL) que muestran una alta expresión en piel y sistema inmune, y que no se conocen en el contexto de enfermedades cutáneas. Por lo anterior, estudiamos la expresión de estos genes en algunas de las enfermedades más importantes y frecuentes de la piel.

2.11. Objetivos.

2.11.1. Objetivo general.

Comparar la expresión de los genes ISM1 y METRNL en piel sana con la expresión de estos genes en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel.

2.11.2. Objetivos específicos.

- Cuantificar por medio de la RCP-c la expresión de los genes ISM1 y METRNL en piel sana.
- Cuantificar por medio de la RCP-c la expresión de los genes ISM1 y METRNL en seis enfermedades inflamatorias de la piel.
- Cuantificar por medio de la RCP-c la expresión de los genes ISM1 y METRNL en cuatro enfermedades neoplásicas de la piel.
- Cuantificar por medio de la RCP-c la expresión de los genes ISM1 y METRNL en una enfermedad infecciosa de la piel.

2.12. Hipótesis.

Ho: No existe diferencia significativa en la expresión de los genes ISM1 y/o METRNL en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel y en piel sana.

H1: Si existe diferencia significativa en la expresión de los genes ISM1 y/o METRNL en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel y en piel sana.

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Diseño del estudio.

El presente trabajo es un estudio descriptivo y transversal.

3.2. Selección de los pacientes.

Los pacientes se eligieron de acuerdo a los requisitos señalados.

3.2.1. Criterios de inclusión.

1. Ambos géneros, mayores de 18 años.
2. Pacientes con diagnóstico de alguna de las siguientes enfermedades: dermatitis atópica, psoriasis, prurigo nodular, escleroderma, lupus eritematoso, liquen plano, queratosis actínica, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, micosis fungoide y condiloma acuminado.
3. Tiempo de evolución de la enfermedad indistinto.
4. Con tratamiento o sin tratamiento.

3.2.2. Criterios de exclusión.

1. Falta de consentimiento informado.

3.3. Población y muestra.

Se incluyeron a los pacientes que acudieron durante el periodo de octubre de 2010 a octubre de 2012 al Hospital Universitario de Dermatología, de Düsseldorf, Alemania presentando alguna de las enfermedades descritas anteriormente. Se consideraron como mínimo 5 pacientes por enfermedad y se incluyó además un grupo de controles sanos. Los pacientes y controles recibieron una hoja informativa que leyeron, y firmaron una carta de consentimiento informado. De cada paciente se obtuvo una biopsia de la lesión de piel y de las personas que participaron como controles una biopsia de piel sana. Todos los diagnósticos clínicos fueron comprobados a través de un estudio histológico realizado por un médico patólogo. La tabla 7 resume las enfermedades de piel, controles sanos y número de muestras incluidas.

Tabla 7. Muestras de enfermedades de piel incluidas y controles sanos.

Condición	Número de muestras	Género		Edad media ± DE (años)
		Hombres	Mujeres	
Enfermedades inflamatorias				
Dermatitis atópica	12	9	3	45.5 ± 18.1
Psoriasis	12	11	1	49.8 ± 12.8
Prurigo nodular	6	3	3	70.3 ± 6.8
Escleroderma	7	2	5	52.7 ± 12.8
Lupus eritematoso	10	4	6	51.2 ± 14.4
Liquen plano	12	11	1	59.2 ± 21.5
Enfermedades neoplásicas				
Queratosis actínica	6	5	1	76.1 ± 7
Carcinoma basocelular	12	8	4	67.5 ± 11.2
Carcinoma epidermoide	9	7	2	80 ± 6.5
Micosis fungoide	8	6	2	68.7 ± 18.1
Enfermedades infecciosas				
Condiloma acuminado	12	10	2	39.5 ± 12.8
Controles sanos	10	5	5	62.5 ± 15
Muestras totales	116	81	35	58.7 ± 18.4

DE = desviación estándar.

3.4. Instrumentos y procedimientos.

3.4.1. Obtención de la biopsia.

Se realizó asepsia y antisepsia de la piel, se infiltró piel y tejidos profundos con un anestésico local (clorhidrato de lidocaína a una dosis de 2 a 3 mg/kg) y se colocaron campos estériles. Las muestras obtenidas -de aproximadamente 0.6 x 0.3 cm- se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta ser procesadas.

3.4.2. Procesamiento de las biopsias.

Con cada biopsia de piel de pacientes y controles sanos se realizó: homogeneización del tejido, aislamiento de ARN total, cuantificación de ARN total, síntesis de ADNc así como también RCP-c de los genes ARNr 18S, ISM1 y METRNL.

3.4.2.1. Homogeneización del tejido.

Se añadieron 10 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) (Sigma-Aldrich, Alemania) por cada mL de amortiguador RLT para la lisis de tejidos y células (Qiagen, Alemania). Se agregaron 600 µL del amortiguador RLT a las muestras colocadas en tubos Falcon de 5 mL. De esta manera las muestras se homogeneizaron utilizando el homogeneizador de tejidos, Polytron PT 2500 E (Kynematica AG, Lucerna, Suiza) a una velocidad de 23,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 a 60 segundos. Posterior a su homogeneización, cada muestra fue mantenida en hielo hasta el comienzo del aislamiento de ARN total.

3.4.2.2. Aislamiento de ARN total.

El aislamiento de ARN total se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo RNeasy Mini Kit para purificación de ARN total de tejidos de origen animal (Qiagen, Alemania).

Del volumen total de cada muestra lisada resultado de la homogeneización, se tomaron 700 µL como máximo, se colocaron en las columnas de centrifugación QIAshredder que estaban incorporadas en tubos de colección de 2 mL y se centrifugaron durante 2 minutos a una velocidad de 13,000 rpm. Los eluidos se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se centrifugaron por 3 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente con una pipeta a nuevos tubos de 1.5 mL y se agregaron 600 µL de etanol al 70% mezclándose inmediatamente con la pipeta. La mezcla resultante fue de aproximadamente 1.3 mL (sobrenadante + etanol). Se tomaron 700 µL de esta mezcla, se colocaron en las minicolumnas RNeasy que estaban incorporadas en tubos de colección de 2 mL y se centrifugaron por 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el primer eluido, se colocó el volumen restante de la mezcla (aproximadamente 600 µL) en las mismas minicolumnas RNeasy incorporadas en tubos de colección y se centrifugaron las muestras durante 15 segundos a 10,000 rpm. También se desechó el segundo eluido de los tubos de colección, se agregaron 700 µL del amortiguador RW1 a las minicolumnas RNeasy para lavar la membrana donde se adhiere el ARN, posteriormente se centrifugaron durante 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el eluido y los tubos de colección. Las minicolumnas RNeasy se transfirieron a nuevos tubos de colección de 2 mL. Se adicionaron 500 µL del amortiguador RPE a las minicolumnas para un segundo lavado de la membrana y se centrifugaron

durante 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el eluido y se agregaron 500 μ L del amortiguador RPE a las minicolumnas y se centrifugaron durante 2 minutos a 10,000 rpm. Se desechó el eluido y los tubos de colección. Las minicolumnas RNeasy fueron colocadas en nuevos tubos de colección de 2 mL y se realizó una centrifugación de un minuto a 13,000 rpm para secar la membrana. Los tubos de colección fueron desechados y las minicolumnas RNeasy fueron transferidas a tubos estériles de 1.5 mL. Se agregaron 50 μ L de agua libre de ribonucleasa (RNasa) directamente a la membrana de las minicolumnas RNeasy y se realizó una centrifugación de un minuto a 10,000 rpm. Se tomó el eluido de esta última centrifugación, se colocó de nuevo directamente en la membrana de las minicolumnas y se realizó otra centrifugación de un minuto a 10,000 rpm. Finalmente, las columnas RNeasy se eliminaron. El eluido resultante se congeló a -80°C hasta ser utilizado para la cuantificación de ARN total.

Los pasos que requirieron centrifugación se efectuaron a temperatura ambiente (25°C) en una microcentrífuga estándar (Eppendorf, Alemania).

3.4.2.3. Cuantificación de ARN total.

La cuantificación de ARN total se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA). Una cantidad de 1.2 μ L por muestra fue suficiente para la cuantificación. Las muestras con una concentración de ARN total mayor o igual a 30 ng/ μ L se incluyeron en el estudio. La pureza del ARN se evaluó de acuerdo con la relación de absorbancia del ARN a 260/280 nanómetros. Se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de absorbancia indican ARN de buena calidad. En general todas las muestras incluidas tuvieron un valor cercano a 2.0 unidades.

3.4.2.4. Síntesis de ADNc.

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 4 μ g de ARN total en un volumen final de 10 μ L de agua tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) (Carl Roth, Alemania).

Se preparó la mezcla A en las siguientes cantidades:

- 1.5 μ L de amortiguador de la primera hebra 5X (250 mM de hidrocloreuro de Tris, pH 8.3 a temperatura ambiente, 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl_2 ; Invitrogen).

- 1 μL de inhibidor de RNasa/Rnasin (40 U/ μL ; Promega).
- 1 μL de desoxirribonucleasa I (DNasa I) recombinante, libre de RNasa (10 U/ μL ; Roche).
- 2.5 μL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).

Se agregaron 6 μL de la mezcla A a los 10 μL de ARN total, se mezcló con la pipeta y se realizó una centrifugación breve. Los tubos se incubaron durante 20 minutos a 37°C y 10 minutos a 70°C, en el programa -0 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).

Se preparó la mezcla B en las siguientes cantidades:

- 1 μL de oligodesoxitimidilato (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Invitrogen).
- 0.4 μL de hexámero aleatorio (252.2 μM ; Promega).
- 2.6 μL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).

Se agregaron 4 μL de la mezcla B a cada muestra, se mezcló con la pipeta y se realizó una centrifugación breve. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 70°C, en el programa -1 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).

Se preparó la mezcla C en las siguientes cantidades:

- 4.5 μL del amortiguador de la primera hebra (5X; Invitrogen).
- 1.5 μL de desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (10 mM; Bioline).
- 1 μL de ditiotritol (0.1 M; Invitrogen).
- 0.5 μL unidades de inhibidor de RNasa/Rnasin (40 U/ μL ; Promega).
- 1.5 μL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).

Se agregaron 9 μL de la mezcla C a cada muestra, se mezcló con la pipeta y se realizó una centrifugación breve. Las muestras se incubaron durante 2 minutos a 42°C en el programa -2 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).

- Se agregó 1 μL de transcriptasa reversa (200 U/ μL ; Invitrogen) a cada muestra, se mezcló con la pipeta y se realizó una centrifugación breve teniendo un volumen final de reacción de 30 μL .

Finalmente, en términos de concentración por tubo quedó: amortiguador de la primera hebra (50 mM de hidrocloreuro de Tris, 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$), 2 U/ μ L del inhibidor de RNasa/Rnasin, 0.33 U/ μ L de DNasa I recombinante, 0.016 μ g/ μ L de oligodesoxitimidilato, 3.3 μ M de hexámero aleatorio, 500 μ M de desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato y 3.3 mM de ditiotritol.

Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción las muestras se incubaron durante 50 minutos a 42°C y posteriormente 10 minutos 70°C en el programa -3 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).

Al final de la reacción de amplificación se ajustó la concentración de ADNc a 10 μ g/ μ L. Para llevar a cabo la RCP-c el ADNc se ajustó a 2.5 μ g/ μ L, y se congeló a -20°C hasta ser utilizado.

3.4.2.5. RCP-c.

Como gen control se seleccionó el gen ARNr 18S, que previamente se utilizó para comparar la expresión de genes en piel sana y en tejidos patológicos⁹⁸.

Se preparó la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen ARNr 18S:

- 12.5 μ L de la mezcla maestra de RCP universal TaqMan (2X; Applied Biosystems).
- 0.15 μ L del cebador hacia delante del gen ARNr 18S (10 μ M; Life Technologies).
- 0.15 μ L del cebador hacia atrás del gen ARNr 18S (10 μ M; Life Technologies).
- 0.15 μ L de la sonda del gen ARNr 18S (40 μ M; Life Technologies).
- 2.05 μ L de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).
- Se colocaron 15 μ L de la mezcla y 10 μ L del ADNc (2.5 μ g/ μ L) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems). El volumen final de reacción fue de 25 μ L que en términos de concentración quedó: 1X de la mezcla maestra de RCP universal TaqMan, 0.06 μ M del cebador hacia delante del gen ARNr 18S, 0.06 μ M del cebador hacia atrás del gen ARNr 18S y 0.24 μ M de la sonda del gen ARNr 18S.

Se cubrió la placa con una cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), se centrifugó por 2 minutos a 1,200 rpm y se colocó en el termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Sólo las muestras que obtuvieron un valor de expresión del gen ARNr 18S entre 14.00 y 15.90 ciclos fueron incluidas en el estudio.

Se preparó la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen ISM1:

- 12.5 μL de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green (2X; Applied Biosystems).
- 2.5 μL de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen ISM1 (2 μM ; Eurofins MWG).
- Se colocaron 15 μL de la mezcla y 10 μL del ADNc (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems). El volumen final de reacción fue de 25 μL que en términos de concentración quedó: 1X de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green y 0.2 μM de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen ISM1.

Se cubrió la placa con una cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), se centrifugó por 2 minutos a 1,200 rpm y se colocó en el termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Se preparó la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen METRNL:

- 12.5 μL de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green (2X; Applied Biosystems).
- 2.5 μL de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen METRNL (2 μM ; Eurofins MWG).
- Se colocaron 15 μL de la mezcla y 10 μL del ADNc (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems). El volumen final de reacción fue de 25 μL que en términos de concentración quedó: 1X de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green y 0.2 μM de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen METRNL.

Se cubrió la placa con una cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), se centrifugó por 2 minutos a 1,200 rpm y se colocó en el termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Una vez obtenida la expresión de los tres genes (ARNr 18S, ISM1 y METRNL) se dividió la expresión del gen ISM1 entre la expresión del gen ARNr 18S y la expresión del gen METRNL entre la expresión del gen ARNr 18S; los valores obtenidos se tomaron como la cuantificación relativa de los genes ISM1 y METRNL en las muestras estudiadas y se representaron como unidades relativas (UR).

Las secuencias de los cebadores de los genes ISM1 y METRNL utilizados en este trabajo se diseñaron con la herramienta “Primer-BLAST” del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y se describen en la tabla 8. No se presentan las secuencias de los cebadores utilizados para el análisis del gen ARNr 18S, dado que la compañía de donde se adquirió este producto no revela la secuencia de los cebadores de este gen (Life Technologies).

Tabla 8. Secuencias de los cebadores de los genes ISM1 y METRNL.

Gen	Secuencia del cebador hacia adelante 5'-3'	Secuencia del cebador hacia atrás 5'-3'
ISM1	CCCAGCTGCCCCTGCTCCTA	CAGCTTCTCCTTGGGCCCCGC
METRNL	CAGGAGCTGTCTGCGCCGTA	TCGTCACGCGCAGGTGGATG

La síntesis de ADNc y la cuantificación por medio de RCP-c de la expresión de los genes ARNr 18S, ISM1 y METRNL se realizaron en tres ocasiones para verificar los resultados.

3.5. Variables.

3.5.1. Independiente.

Dermatitis atópica, psoriasis, prurigo nodular, escleroderma, lupus eritematoso, liquen plano, queratosis actínica, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, micosis fungoide y condiloma acuminado.

3.5.2. Dependiente.

Expresión de los genes ISM1 y METRNL.

3.6. Plan de Análisis.

Se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para diferentes muestras con el programa estadístico GraphPad prism versión 5.03, que nos permitió comparar las medianas de la expresión de los genes ISM1 y METRNL en piel sana y en enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas de la piel, con un nivel de significancia estadística de P menor de 0.05.

3.7. Aspectos Éticos, Normativos y de Seguridad.

Este estudio se ajustó a la Declaración de Helsinki⁹⁹, por lo que cumplió con la normatividad que rige a la investigación en materia de salud, aplicada a humanos. No se utilizaron procedimientos que pusieran en riesgo la integridad o salud de los participantes del estudio.

Asimismo todos los pacientes que participaron en este estudio, fueron informados acerca del uso de la muestra que ellos donaron, y firmaron un documento de consentimiento informado, que respaldó la información que se les brindó y la autorización del uso de las muestras para fines de investigación.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS.

Todos los resultados de cuantificación por medio de RCP-c de la expresión de los genes ISM1 y METRNL en las enfermedades estudiadas se reportaron como unidades relativas (UR) en comparación con la expresión del gen del ARNr 18S y todas ellas se compararon contra la expresión de los mismos genes en 10 muestras de piel sana.

4.1. Enfermedades inflamatorias.

4.1.1. Dermatitis atópica.

Se analizaron 12 muestras de pacientes con dermatitis atópica comparándose con 10 muestras de piel sana. La figura 18 muestra los resultados de los análisis. Como podemos observar ambos genes mostraron una mayor expresión en esta enfermedad en comparación con piel sana. Los resultados fueron estadísticamente significativos con una P de 0.036 en el análisis del gen ISM1 y una P de 0.034 en el análisis del gen METRNL.

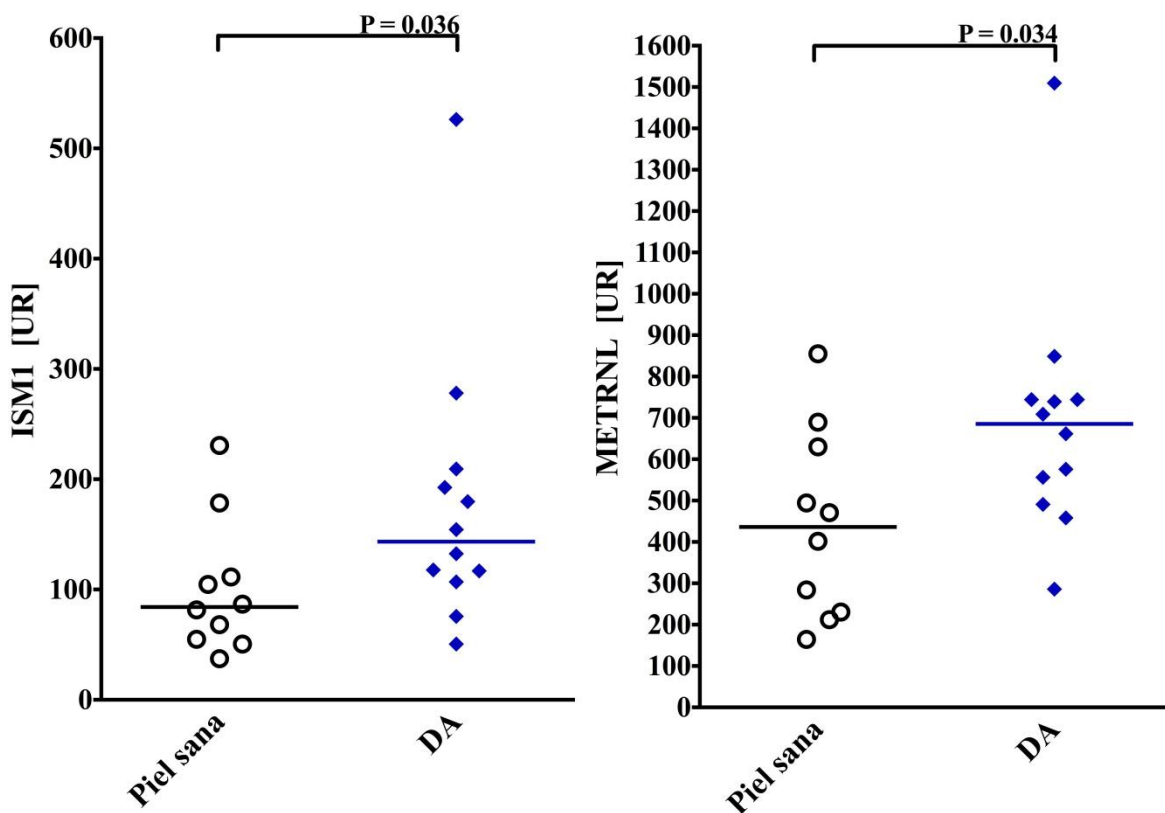


Figura 18. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en dermatitis atópica.

4.1.2. Psoriasis.

Se analizaron 12 muestras de pacientes con psoriasis comparándose con 10 muestras de piel sana. La figura 19 muestra los resultados de los análisis. Como podemos observar la expresión del gen ISM1 en psoriasis mostró un patrón de expresión similar a su expresión en piel sana; por el contrario el gen METRNL exhibió una mayor expresión en psoriasis que en piel sana. Esta expresión fue estadísticamente significativa con una P de 0.001.

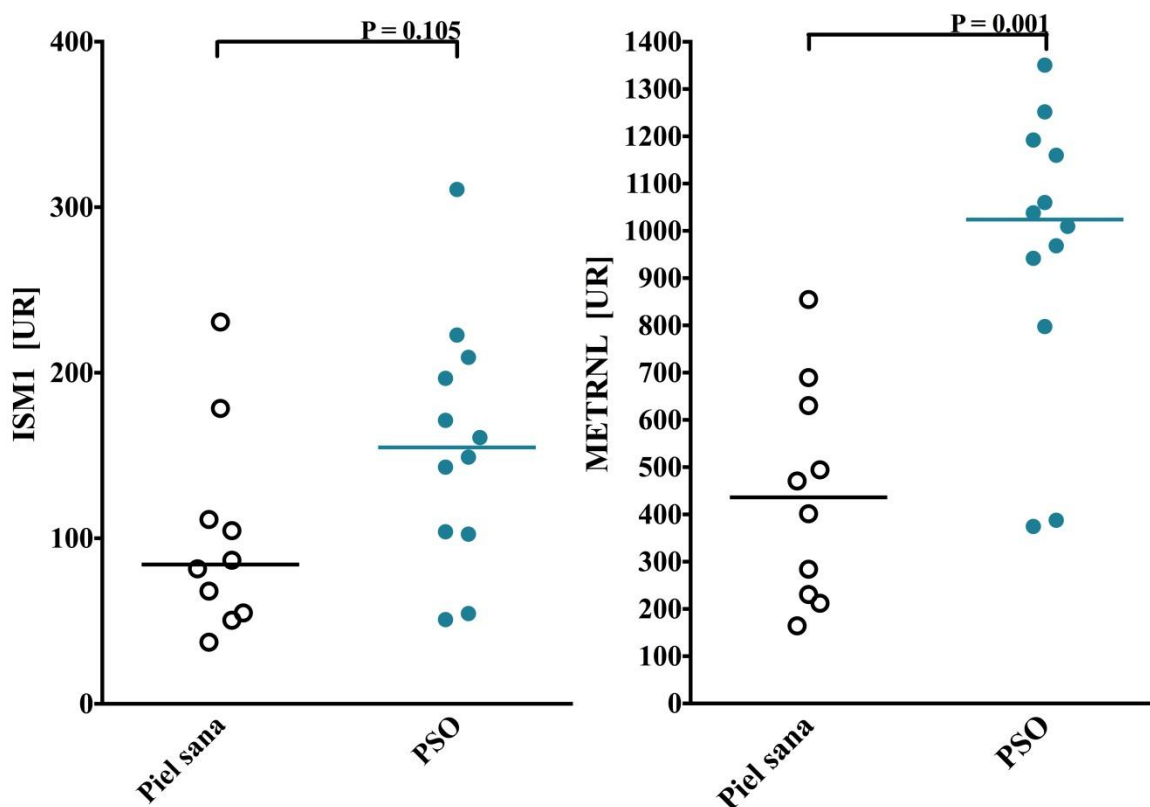


Figura 19. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en psoriasis.

4.1.3. Prúrigo nodular.

Se analizaron 6 muestras de pacientes con prúrigo nodular comparándose con 10 muestras de piel sana. La figura 20 muestra los resultados de los análisis. La expresión del gen ISM1 en prúrigo nodular fue similar a su expresión en piel sana, mientras que la expresión del gen METRNL fue mayor en esta enfermedad en comparación con piel sana (P de 0.045).

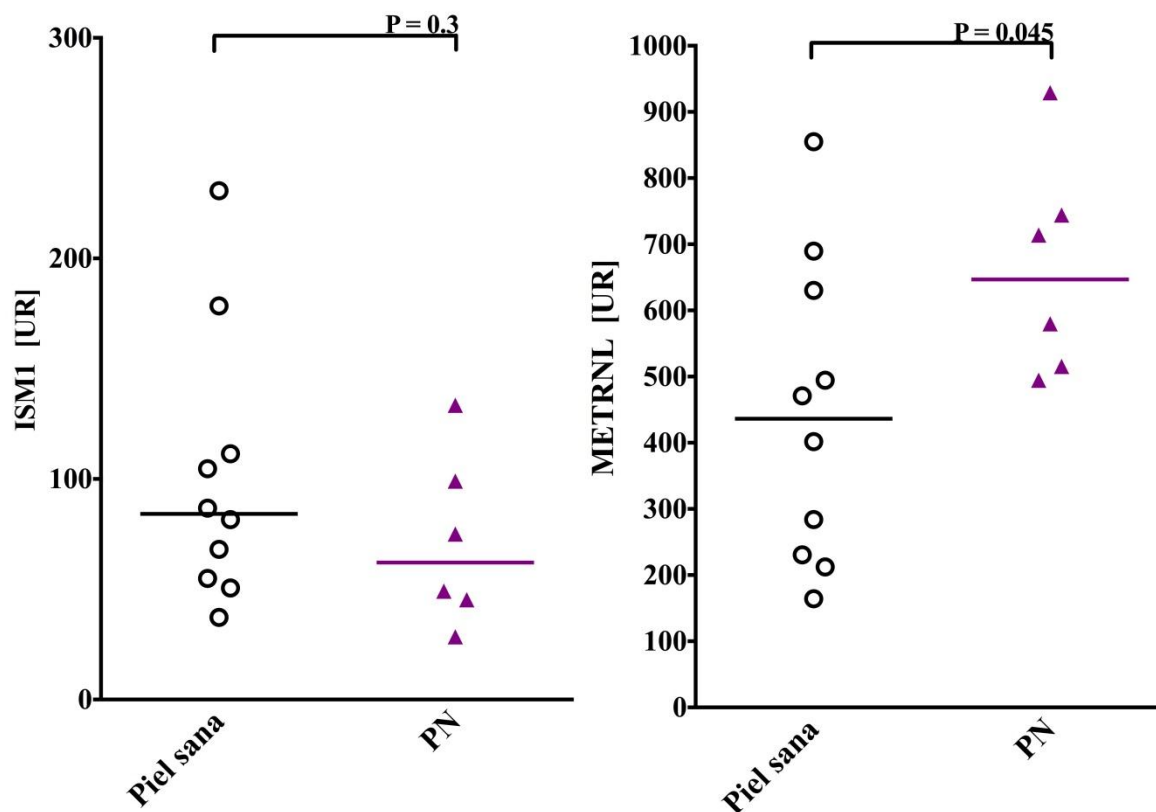


Figura 20. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en prúrigo nodular.

4.1.4. Escleroderma.

Se compararon 10 muestras de piel sana con 7 muestras de lesiones de piel de pacientes con escleroderma: 6 pacientes con diagnóstico de escleroderma variedad localizada y un paciente con diagnóstico de escleroderma variedad sistémica. Los genes ISM1 y METRNL en esta patología no mostraron una expresión estadísticamente significativa (figura 21).

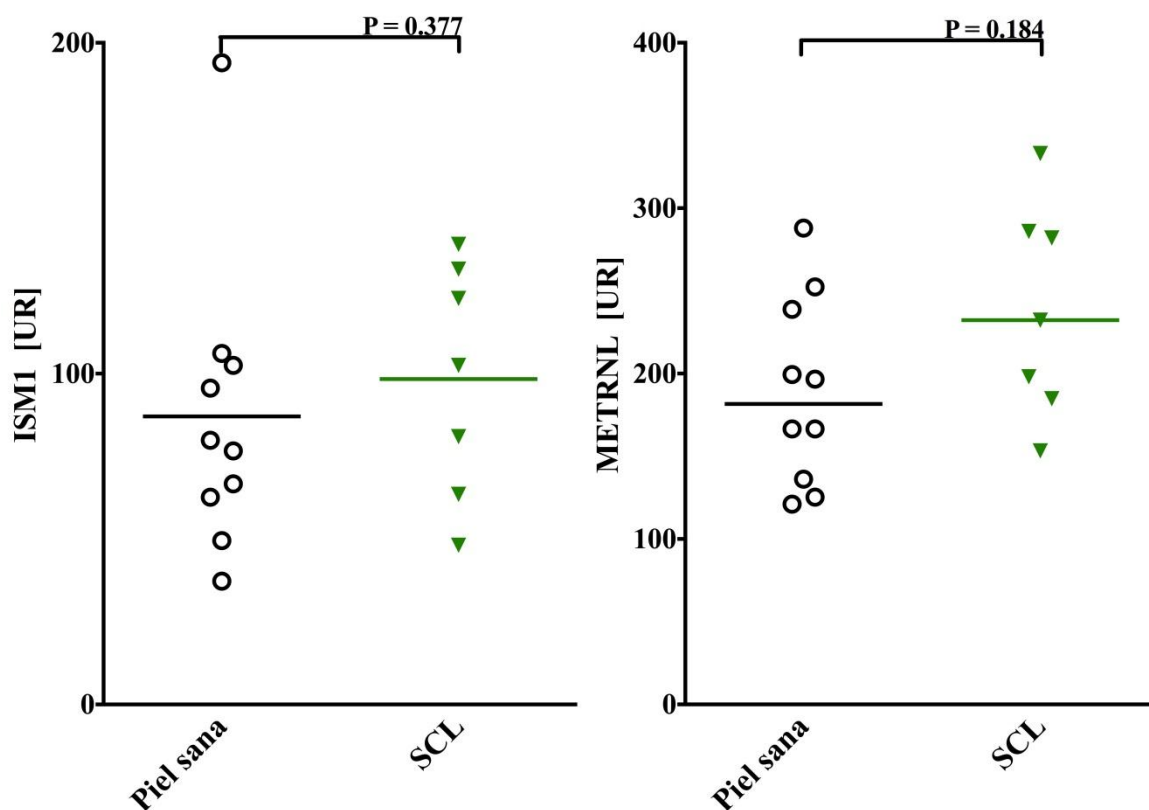


Figura 21. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en escleroderma.

4.1.5. Lupus eritematoso.

Se analizó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 10 muestras de lesiones de piel de pacientes con lupus eritematoso (7 muestras de pacientes con lupus eritematoso cutáneo y 3 muestras de pacientes con lupus eritematoso sistémico). Se compararon con 10 muestras de piel sana. En la figura 22 se muestra que los genes ISM1 y METRNL no se expresaron significativamente (P de 0.215 y 0.755 respectivamente).

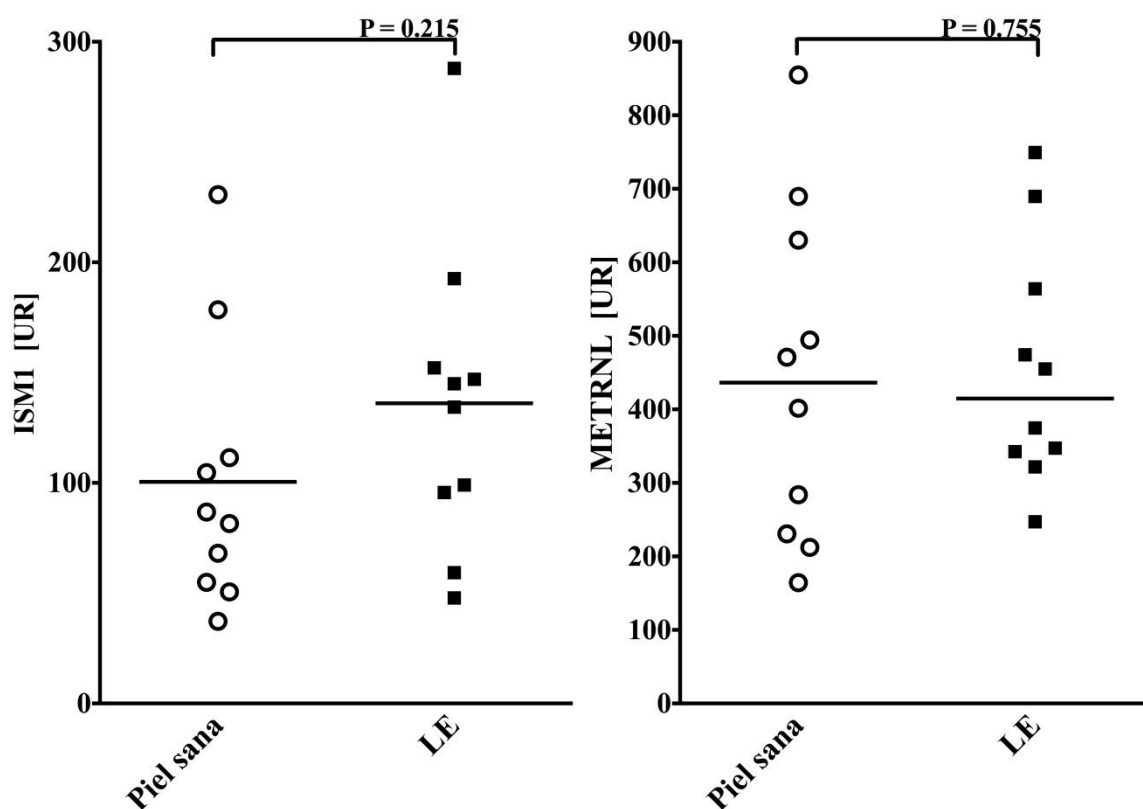


Figura 22. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en lupus eritematoso.

4.1.6. Liquen plano.

Se cuantificó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 12 muestras de lesiones de piel de pacientes con diagnóstico de liquen plano. Los análisis se compararon con 10 muestras de piel sana y se muestran en la figura 23. No se encontró diferencia significativa en la expresión de ISM1 y METRNL en esta enfermedad.

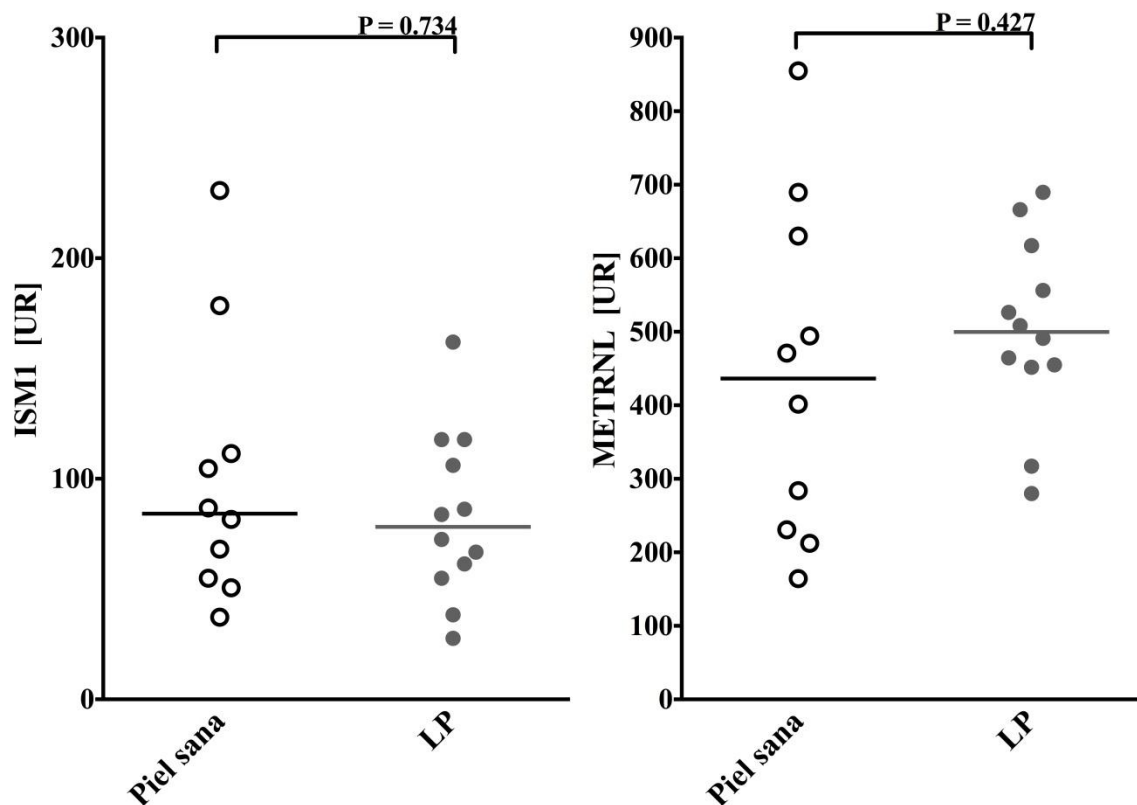


Figura 23. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en liquen plano.

4.2. Enfermedades neoplásicas.

4.2.1. Queratosis actínica.

Se cuantificó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 6 muestras de lesiones de piel de pacientes con queratosis actínica. Los análisis se compararon con 10 muestras de piel sana y se muestran en la figura 24. El gen ISM1 mostró la misma expresión en esta enfermedad que en piel sana, mientras que el gen METRNL exhibió una expresión estadísticamente significativa (P de 0.017).

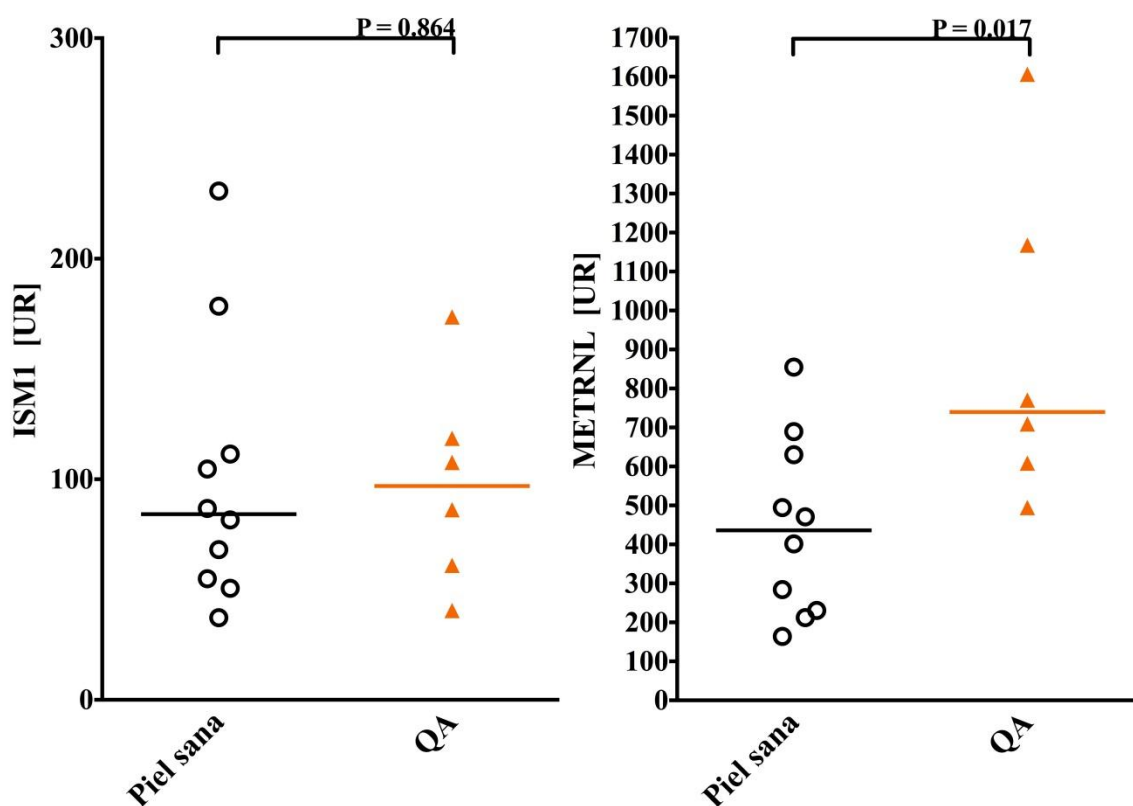


Figura 24. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en queratosis actínica.

4.2.2. Carcinoma basocelular.

Se cuantificó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 12 muestras de lesiones de piel de pacientes con carcinoma basocelular y se compararon con 10 muestras de piel sana. En la figura 25 se observa que no hubo una diferencia significativa en la expresión de ISM1 y METRNL en este cáncer de piel.

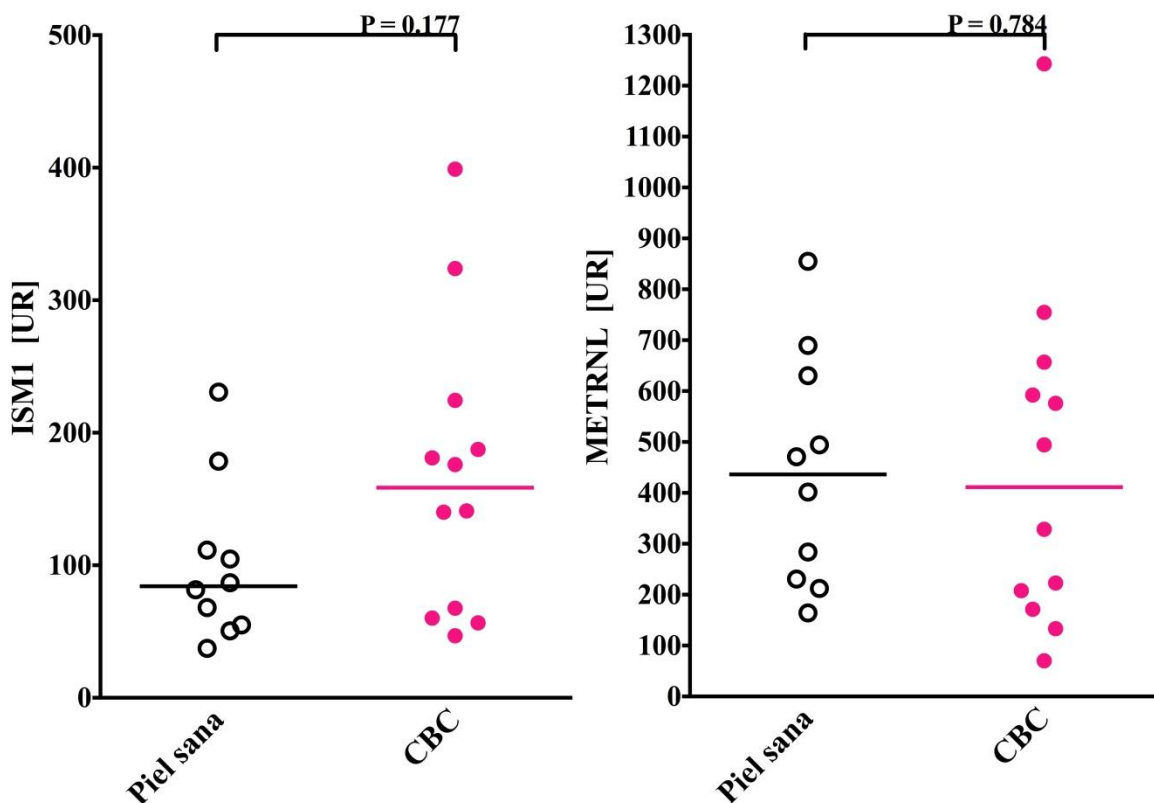


Figura 25. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en carcinoma basocelular.

4.2.3. Carcinoma epidermoide.

Se cuantificó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 9 muestras de lesiones de piel de pacientes con carcinoma epidermoide. Los análisis se compararon con 10 muestras de piel sana y se muestran en la figura 26. Ambos genes mostraron un patrón de expresión similar en este cáncer y en piel sana.

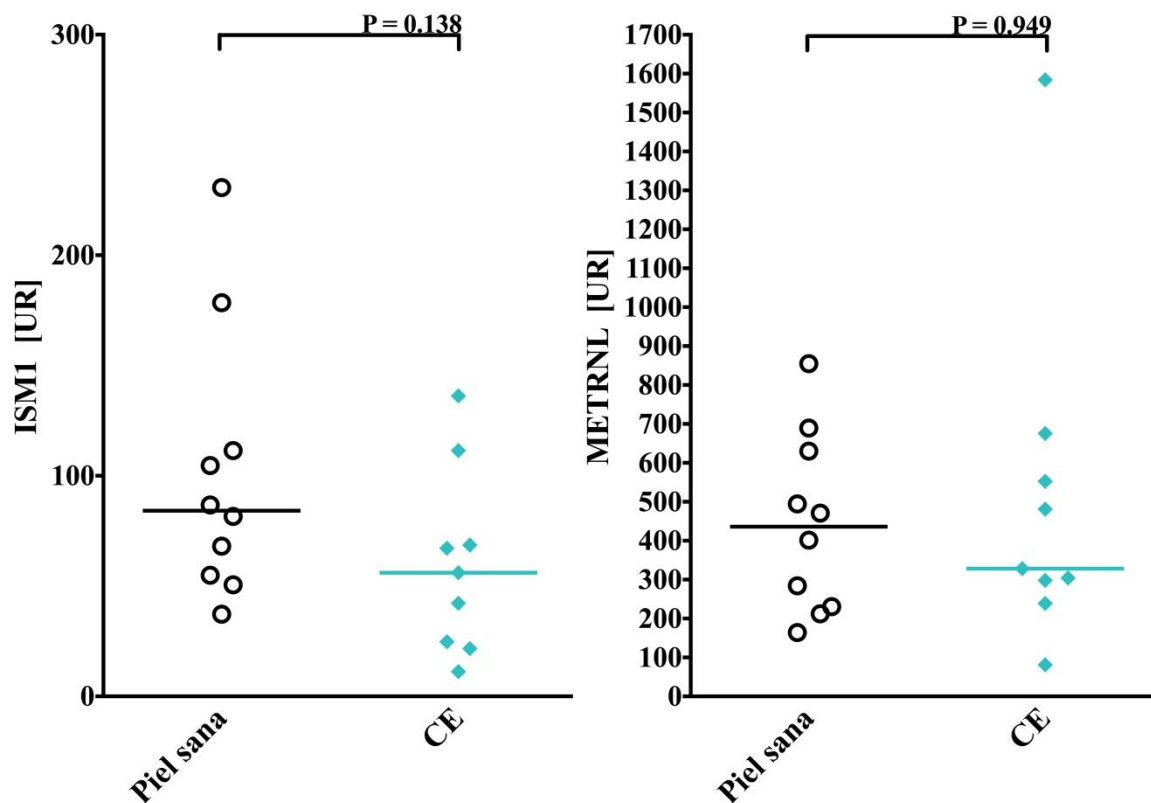


Figura 26. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en carcinoma epidermoide.

4.2.4. Micosis fungoide.

Se estudió la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 8 muestras de lesiones de piel de pacientes con diagnóstico de micosis fungoide. Los análisis se compararon con 10 muestras de piel sana y se muestran en la figura 27. Ambos genes mostraron una expresión en esta enfermedad similar a la observada en piel sana.

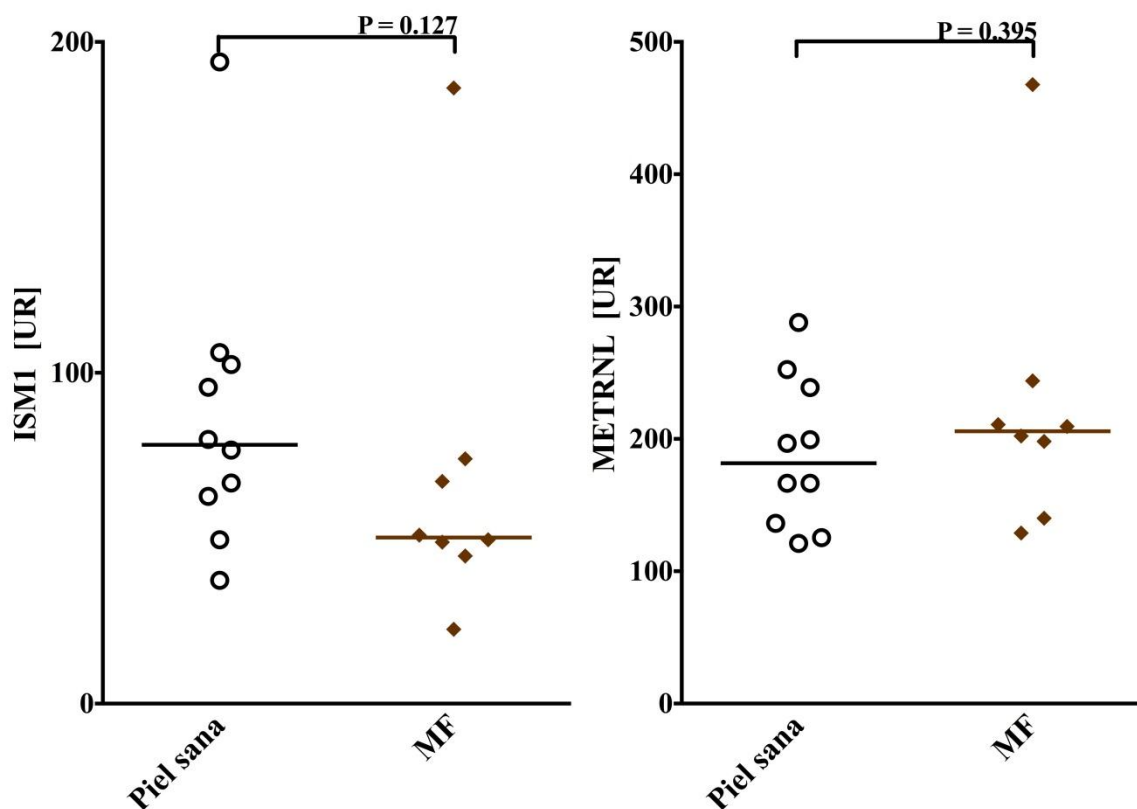


Figura 27. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en micosis fungoide.

4.3. Enfermedades infecciosas.

4.3.1. Condiloma acuminado.

Se estudió la expresión de los genes ISM1 y METRNL en 12 muestras de lesiones de pacientes con diagnóstico de condiloma acuminado. Los análisis se compararon con 10 muestras de piel sana y se muestran en la figura 28. Esta enfermedad infecciosa presentó una menor expresión del gen ISM1 estadísticamente significativa (P menor que 0.0001). El gen METRNL presentó un patrón de expresión similar en esta patología al patrón de expresión mostrado en piel sana.

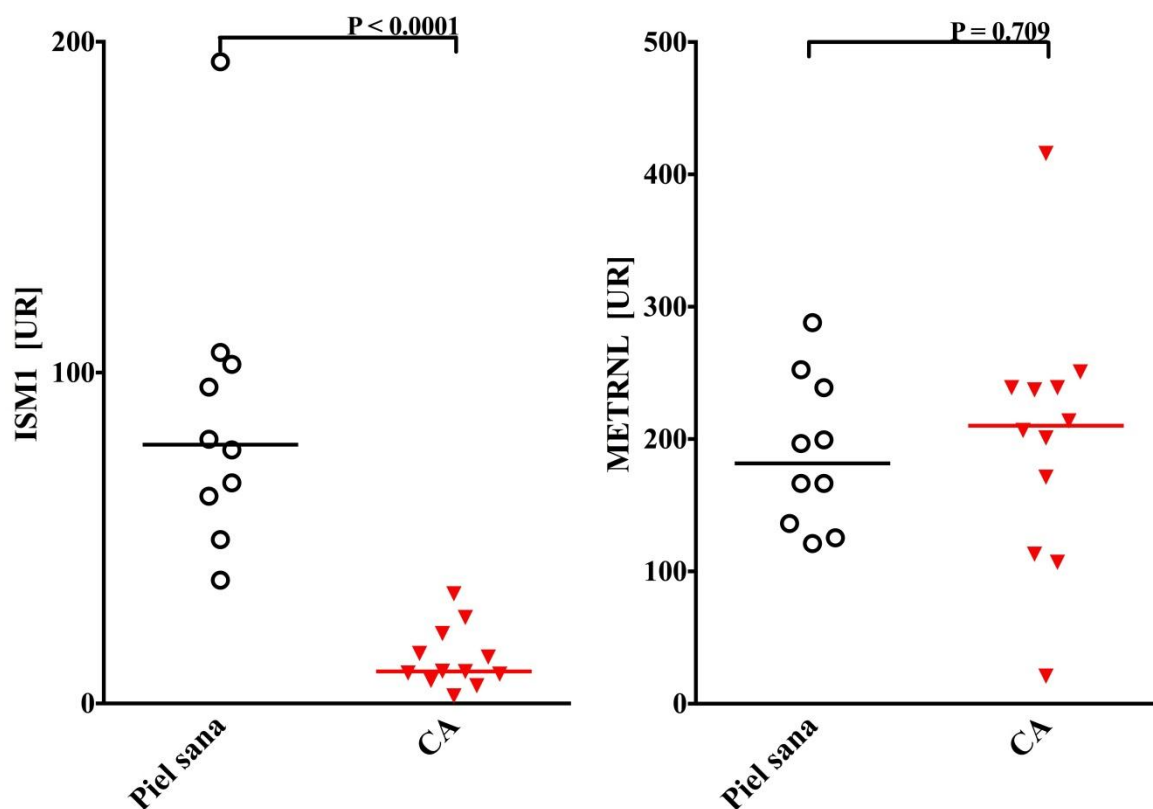


Figura 28. Expresión de los genes ISM1 y METRNL en condiloma acuminado.

Los resultados de la expresión de los genes ISM1 y METRNL en las enfermedades de piel incluidas en este trabajo se resumen en las tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 9. Resultados de la expresión del gen ISM1 en las enfermedades de piel estudiadas.

Enfermedades	Pacientes¶	Controles sanos¶	Valor de P*
Inflamatorias			
Dermatitis atópica	143.3 (111.9-200.9)	84.1 (54.9-111.4)	0.036
Psoriasis	155 (103.2-203)	84.1 (54.9-111.4)	0.105
Prúrigo nodular	62.1 (45.2-99)	84.1 (54.9-111.4)	0.3
Escleroderma	102.5 (63.5-131.5)	78.2 (62.6-102.5)	0.377
Lupus eritematoso	139.7 (95.6-152.1)	84.1 (54.9-111.4)	0.215
Liquen plano	78.1 (58.1-111.9)	84.1 (54.9-111.4)	0.734
Neoplásicas			
Queratosis actínica	96.9 (60.9-118.5)	84.1 (54.9-111.4)	0.864
Carcinoma basocelular	158.5 (63.8-205.8)	84.1 (54.9-111.4)	0.177
Carcinoma epidermoide	56 (23.2-89.9)	84.1 (54.9-111.4)	0.138
Micosis fungoide	50.2 (46.7-70.5)	78.2 (62.6-102.5)	0.127
Infecciosas			
Condiloma acuminado	9.6 (7.9-18.1)	78.2 (62.6-102.5)	< 0.0001

¶ Mediana expresada en UR; rango intercuartil en paréntesis.

* Significancia estadística: P menor que 0.05.

Tabla 10. Resultados de la expresión del gen METRNL en las enfermedades de piel estudiadas.

Enfermedades	Pacientes¶	Controles sanos¶	Valor de P*
Inflamatorias			
Dermatitis atópica	685.3 (523.6-744.2)	436.3 (230.6-630.1)	0.034
Psoriasis	1024 (869.8-1176.0)	436.3 (230.6-630.1)	0.001
Prúrigo nodular	646.9 (515.4-744.2)	436.3 (230.6-630.1)	0.045
Escleroderma	232.3 (184.7-285.9)	181.6 (136.2-238.7)	0.184
Lupus eritematoso	414.8 (342.4-564)	436.3 (230.6-630.1)	0.755
Liquen plano	499.7 (453.4-586.7)	436.3 (230.6-630.1)	0.427
Neoplásicas			
Queratosis actínica	739.7 (608.7-1167.8)	436.3 (230.6-630.1)	0.017
Carcinoma basocelular	411.5 (189.5-624.5)	436.3 (230.6-630.1)	0.784
Carcinoma epidermoide	328.5 (268.4-613.9)	436.3 (230.6-630.1)	0.949
Micosis fungoide	209.3 (198-243.8)	181.6 (136.2-238.7)	0.395
Infecciosas			
Condiloma acuminado	213.7 (112.9-238.7)	181.6 (136.2-238.7)	0.709

¶ Mediana de UR; rango intercuartil en paréntesis.

* Significancia estadística: P menor que 0.05.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

5.1. Discusión.

En el presente estudio se demostró que los genes ISM1 y METRNL tienen una expresión diferente y estadísticamente significativa en algunas enfermedades de la piel en comparación con piel sana.

5.1.1. Enfermedades inflamatorias.

En dermatitis atópica encontramos una mayor expresión de ISM1 (P igual a 0.036) y de METRNL (P igual a 0.034). Esta condición se caracteriza por un importante componente inflamatorio e inmunitario, y siendo que ambos genes muestran expresión en sistema inmune (figura 5 y 6), el resultado de esta significancia estadística podría indicar una relación de estos genes con dicha enfermedad. Sin embargo, cuando observamos la distribución de la expresión en las 12 muestras estudiadas de dermatitis atópica, es de notarse que solo una de las muestras mostró una alta expresión, las otras 11 muestras incluidas exhiben una expresión de ISM1 y METRNL aproximadamente en el mismo rango que la expresión observada de estos genes en piel sana (figura 18). No logramos identificar alguna característica clínica en particular del paciente donador de esta muestra que fuera diferente al de los otros pacientes incluidos. Sin la presencia de esta muestra con alta expresión, aún se mantiene una tendencia por parte de ambos genes a una mayor expresión, sin embargo no existiría significancia estadística. No obstante lo anterior, muchas enfermedades humanas son heterogéneas a nivel molecular¹⁰⁰⁻¹⁰³, y dermatitis atópica es probablemente una de ellas. Si esta suposición es correcta y existen 2 o más tipos de dermatitis atópica a nivel molecular, ISM1 y/o METRNL podrían estar involucrados con un subtipo de esta enfermedad. Para confirmar esto, se podría estudiar la expresión de estos genes en un número mayor de muestras y analizarse en el contexto de las características clínicas exhibidas en cada paciente.

En psoriasis, encontramos una mayor expresión del gen METRNL (P igual a 0.001). Este hallazgo resulta importante porque se trata de una enfermedad con base inmunológica, que manifiesta una inflamación dérmica con hiperplasia epidérmica.

La respuesta inmune es mediada por citocinas proinflamatorias: como el IFN- γ , el FNT- α , la IL-17, IL-22, IL-23, que son proteínas de secreción con un peso molecular entre 20-30 kDa y producidas principalmente por monocitos activados, macrófagos, CMSP activadas y células dendríticas¹⁰⁴. El FNT- α , es además producido por otras células como los queratinocitos y fibroblastos, que son elementos funcionales y estructurales de la piel^{44,105}.

La participación de estas moléculas en la patogénesis de psoriasis se maneja con fármacos inhibidores del FNT, reflejando una mejoría de los síntomas del paciente⁵⁶. Así mismo, el empleo de inhibidores de la IL-17 o de su receptor, mostraron efectos positivos en los pacientes con psoriasis⁵⁷⁻⁵⁹.

Antes del uso de estos medicamentos, otros estudios también mostraron una mayor expresión de la IL-17 y del FNT- α en las lesiones de psoriasis¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. En este trabajo encontramos una mayor expresión de METRNL en psoriasis, lo cual representa un hallazgo nunca antes descrito. Por otra parte, las características de METRNL son semejantes a las de la IL-17 o el FNT- α , ya que METRNL es una proteína de secreción, con un peso molecular de ~29 kDa, producida por monocitos activados, CMSP activadas y piel. Lo anterior sugiere que METRNL pudiera ser una molécula presente en las lesiones de psoriasis y que participa en el desarrollo y perpetuación de la inflamación que caracteriza a la patogénesis de esta enfermedad.

En prurigo nodular también encontramos una alta expresión del gen METRNL (P de 0.045). Esta enfermedad, se caracteriza por lesiones nodulares en piel altamente pruriginosas. Nos parece interesante el hallazgo previo de un estudio que mostró a través de microarreglos de ADN y RCP-c, una mayor expresión de METRNL en FPLCA⁴², una enfermedad hereditaria caracterizada por prurito crónico y licuefacción de la piel. El prurigo nodular a pesar de ser diferente a FPLCA con respecto a su etiología y patogénesis, presenta de igual manera como síntoma principal el prurito. En dicho estudio se analizaron solo 6 muestras de lesiones de pacientes con FPLCA y se compararon con un grupo control de piel sana; análogamente, nosotros incluimos 6 muestras de prurigo nodular y un grupo control.

Por lo anterior, podemos mencionar que METRNL exhibió una alta expresión en tres patologías que son altamente pruriginosas: FPLCA, prurigo nodular y dermatitis atópica, lo que podría ser indicativo de una relación entre el gen METRNL con la presencia de prurito, como es el caso de la IL-31¹⁰⁹. Adicionalmente, se encontró un incremento en el número de nervios cutáneos y en la expresión de factores neurotróficos en prurigo nodular y dermatitis atópica^{110,111}, lo que también podría sugerir una relación de METRNL con prurito, dado que METRNL pertenece a una familia de factores neurotróficos y se observó una inducción de su expresión en neuritas⁴³. No obstante, más investigaciones deberán realizarse para establecer una posible relación entre METRNL con prurito.

En escleroderma y lupus eritematoso no encontramos una expresión significativa de los genes ISM1 y METRNL. Ambas enfermedades tienen un importante componente inmunitario en su patogénesis, por lo que se esperaba mayor expresión de ISM1 o METRNL. En el caso de escleroderma de las 7 muestras incluidas, 6 fueron representativas de la variedad localizada (menor severidad clínica), y solo una muestra fue de la variedad sistémica, (mayor severidad clínica). En el caso de lupus eritematoso, de las 10 muestras incluidas, 7 correspondieron a la variedad cutánea y 3 a la variedad sistémica. Análogamente al caso de escleroderma, los pacientes con lupus eritematoso cutáneo, presentan menor morbilidad en comparación a los pacientes con lupus eritematoso sistémico. El hecho de que nuestra población estudiada sea principalmente de la variedad localizada de escleroderma como de la variedad cutánea de lupus eritematoso, podría explicar el hecho de que ninguno de estos genes presentó una mayor expresión en estas condiciones.

En liquen plano no identificamos mayor o menor expresión de nuestros genes de estudio. Esta enfermedad tiene un proceso inflamatorio en su patogénesis⁷³⁻⁷⁴, por lo que esperábamos encontrar en ella alguna diferencia significativa de expresión en relación con piel sana de ISM1 y/o METRNL. Sin embargo, la expresión de estos genes en estos pacientes fue igual a la observada en el grupo control. Consideramos que el aumentar la cantidad de muestras no cambiaría este resultado, por el contrario, nuestros datos orientan a suponer que no se induce la expresión de ISM1 y METRNL en esta patología.

5.1.2. Enfermedades neoplásicas.

En queratosis actínica encontramos una mayor expresión del gen METRNL (P igual a 0.017). Esta condición se desarrolla por cambios en la forma, estructura y proceso de división de los queratinocitos (atipia celular), lo que se acompaña de una inflamación dérmica leve⁷⁵⁻⁷⁸. Esta inflamación podría ser una explicación de la mayor expresión de METRNL. En nuestro estudio incluimos 6 muestras de lesiones de queratosis actínica, de las cuales fueron 2 las que mostraron una muy alta expresión, las 4 restantes exhibieron una expresión similar al control (figura 24). Para realizar una comparación más precisa se deberá estudiar a METRNL en una cantidad mayor de muestras de esta enfermedad.

En carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide no se observó diferencia en la expresión de los genes ISM1 y METRNL comparados con los controles. Con nuestros resultados no podríamos relacionar a estos genes con dichos cánceres; sin embargo dado que encontramos una alta expresión del gen METRNL en queratosis actínica, al ser considerada ésta una lesión precursora de hasta el 20% de los casos de carcinoma epidermoide^{76,77}, sería interesante estudiar a METRNL en un número mayor de muestras de este cáncer, analizándose en el contexto de los pacientes que tuvieron como antecedente la presencia de queratosis actínica y compararse con los pacientes que no tuvieron este antecedente, con el fin de identificar si existen diferencias.

En micosis fungoide no encontramos relación de la expresión de los genes ISM1 y METRNL. Esta enfermedad representa una neoplasia de la piel en la que hay un exceso de producción de células T CD4⁺ a nivel cutáneo⁸⁴. Dado que ISM1 es producido particularmente por estos linfocitos (figura 5), supusimos que este gen podría mostrar una mayor expresión en esta condición. No obstante, nuestros resultados no indicaron sobre-expresión de este gen con esta neoplasia. Por otra parte, hay una muestra que exhibió una expresión muy alta de METRNL (figura 27), lo cual es interesante ya que micosis fungoide es una condición que presenta prurito como parte de su sintomatología, especialmente al comienzo de la enfermedad. No nos fue posible comprobar o descartar si el paciente donador de esta muestra presentó prurito, sin embargo consideramos sería interesante estudiar en un mayor número de muestras, para poder identificar o descartar alguna relación de METRNL con esta enfermedad o con el prurito que se presenta en ella.

5.1.3. Enfermedades infecciosas.

En condiloma acuminado, encontramos una menor expresión del gen ISM1 con una alta significancia estadística (P menor que 0.0001). El agente etiológico es el VPH, el cual es exclusivamente intraepitelial y hasta la fecha su capacidad infecciosa sólo se manifiesta en queratinocitos⁸⁸. El organismo en un intento de combatir esta infección genera una respuesta inmune celular caracterizada por un infiltrado de linfocitos T CD4⁺ en los sitios de la lesión. Estos linfocitos se diferencian en distintos linajes (Th1, Th2, Th17 y Treg) dependiendo del proceso que el organismo este enfrentando¹¹². En el caso de condiloma acuminado el linaje predominante es el Th1, que conduce a una producción de interferones, con lo que eventualmente podría eliminar al virus^{88,89}.

Dado que ISM1 es expresado por linfocitos T CD4⁺ activados (figura 5), sería importante determinar si se expresa por un linaje en particular (Th1, Th2, Th17 o Treg) ya que estos se inhiben entre ellos¹¹². El linaje Th1 inhibe al Th2 y Th17, el linaje Th2 inhibe al Th1 y Th17, mientras que los linajes Th17 y Treg se inhiben entre sí. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión del gen ISM1 está ‘inhibida’ en condiloma acuminado, por lo que suponemos que ISM1 es producido por linfocitos T CD4⁺ del linaje Th2 o Th17, ya que estos dos linajes son inhibidos ante la presencia de células derivadas del linaje Th1 (interferones).

La correcta función del gen ISM1 puede ser de tal importancia en piel, que el tener una menor expresión de éste podría ser un factor para que el virus se establezca y cause la enfermedad.

Contrastando los resultados de la expresión de los genes ISM1 y METRNL en los tres grupos de enfermedades de piel (inflamatorias, neoplásicas e infecciosas), observamos una tendencia de mayor expresión de ambos genes en procesos inflamatorios, no así en los procesos neoplásicos, en los que solo nos fue posible asociar una mayor expresión del gen METRNL en queratosis actínica. Por el contrario, en el caso particular del gen ISM1, fue altamente significativa su menor expresión en condiloma acuminado, lo cual nos sugiere que este gen tenga participación en procesos virales.

5.2. Conclusiones.

En este trabajo se comparó la expresión de los genes ISM1 y METRNL en piel sana y en distintas patologías de la piel que incluyeron enfermedades inflamatorias, neoplásicas e infecciosas. Encontramos que estos genes se expresan diferencialmente, de tal manera que observamos expresión aumentada estadísticamente significativa de ambos genes en dermatitis atópica. Por su parte, psoriasis, prurigo nodular y queratosis actínica exhibieron una expresión estadísticamente significativa mayor de METRNL en comparación con piel sana y solo en condiloma acuminado se observó una inhibición de la expresión de ISM1. Lo anterior nos permitió aceptar la hipótesis alterna y rechazar la hipótesis nula. Otras patologías como escleroderma, lupus eritematoso, liquen plano, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide y micosis fungoide, no mostraron diferencia significativa en la expresión de estos genes con respecto a piel sana. En conjunto nuestros hallazgos abren la posibilidad de nuevos estudios que nos permitan elucidar los factores que participan regulando la sobreexpresión o inhibición de estos genes y su participación en el desarrollo de las patologías aquí estudiadas y algunas otras.

Referencias.

1. Weiling F. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822-1884. (1991). *Am J Med Genet.* 40:1-25.
2. Roll-Hansen N. (2009). Sources of Wilhelm Johannsen's genotype theory. *J Hist Biol.* 42:457-493.
3. Noble D. (2008). Genes and causation. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 366:3001-3015.
4. Crick F, Watson J. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171:737-738.
5. Crick F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature.* 227:561-563.
6. Baltimore D. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature.* 226:1209-1211.
7. Temin HM, Mizutani S. (1970). "Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus". *Nature.* 226:1211-1213.
8. Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51:263-273.
9. Mullis KB, Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155:335-350.
10. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE. (1985). The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 13:2399-2412.
11. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 321:674-679.

12. Watson JD, Jordan E. (1989). The human genome program at the National Institutes of Health. *Genomics*. 5:654-656.
13. Cook-Deegan RM. (1989). The Alta Summit, December 1984. *Genomics*. 5:661-663.
14. Maskos U, Southern EW. (1993). A novel method for the analysis of multiple sequence variants by hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 21:2267-2268.
15. Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 251:767-73.
16. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 270:467-470.
17. Vierstraete A. (1999). Principle of the PCR. Obtenida en diciembre de 2012, de <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
18. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology (N Y)*. 11:1026-1030.
19. Cantor CR. (1990). Orchestrating the Human Genome Project. *Science*. 248:49-51.
20. Little PF. (2005). Structure and function of the human genome. *Genome Res*. 15:1759-1766.
21. The ENCODE Project consortium. (2004). The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 306:636-640.
22. NCBI. (2007). MICROARRAYS: CHIPPING AWAY AT THE MYSTERIES OF SCIENCE AND MEDICINE. Obtenida en diciembre de 2012, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>.

23. Wong DJ, Chang HY. (2005). Learning more from microarrays: insights from modules and networks. *J Invest Dermatol.* 125:175-182.
24. Brown PO, Botstein D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.* 21:33-37.
25. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 403:503-511.
26. Copland JA, Davies PJ, Shipley GL, Wood CG, Luxon BA, Urban RJ. (2003). The use of DNA microarrays to assess clinical samples: the transition from bedside to bench to bedside. *Recent Prog Horm Res.* 58:25-53.
27. Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, Bumgarner RE, Bushel PR, Chaturvedi K, Choi D, Cunningham ML, Deng S, Dressman HK, Fannin RD, Farin FM, Freedman JH, Fry RC, Harper A, Humble MC, Hurban P, Kavanagh TJ, Kaufmann WK, Kerr KF, Jing L, Lapidus JA, Lasarev MR, Li J, Li YJ, Lobenhofer EK, Lu X, Malek RL, Milton S, Nagall SR, O'malley JP, Palmer S, Pattee P, Paules RS, Perou CM, Phillips K, Qin LX, Qiu Y, Quigley SD, Rodland M, Rusyn I, Samson LD, Schwartz DA, Shi Y, Shin JL, Sieber SO, Slifer S, Speer MC, Spencer PS, Sproles DI, Swenberg JA, Suk Wa, Sullivan RC, Tian R, Tennant RW, Todd SA, Tucker CJ, Van Houten B, Weis BK, Xuan S, Zarbl H; Members of the Toxicogenomics Research Consortium. (2005). Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods.* 2:351-356.
28. Sahi R, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Nelson SF. (2003). Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene.* 22:4918-4923.

29. Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Dore C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M, Scott J. (1997). Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet.* 16:197-201.
30. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. (1999). Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet.* 21:76-83.
31. Blumenber M. (2006). DNA microarrays in dermatology and skin biology. *OMICS.* 10:243-260.
32. Roth RB, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, Zlotnik A. 2006. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics.* 7:67-80.
33. Lee J, Hever A, Willhite D, Zlotnik A, Hevezi P. (2005). Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *Faseb J.* 19:1356-1358.
34. Papsidero LD, Kuriyama M, Wang MC, Horoszewicz J, Leong SS, Valenzuela L, Murphy GP, Chu TM. (1981). Prostate antigen: a marker for human prostate epithelial cells. *J Natl Cancer Inst.* 66:37-42.
35. Pera EM, Kim JI, Martinez SL, Brechner M, Li SY, Wessely O, De Robertis EM. (2002). Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer. *Mech Dev.* 116:169-172.
36. Adams JC, Lawler J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a009712.

37. Ciccarelli FD, Doerks T, Bork P. (2002). AMOP, a protein module alternatively spliced in cancer cells. *Trends Biochem Sci.* 27:113-115.
38. Xiang W, Ke Z, Zhang Y, Cheng GH, Irwan ID, Sulochana KN, Potturi P, Wang Z, Yang H, Wang J, Zhuo L, Kini RM, Ge R. (2011). Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *J Cell Mol Med.* 15:359-374.
39. Zhang Y, Chen M, Venugopal S, Zhou Y, Xiang W, Li YH, Lin Q, Kini RM, Chong YS, Ge R. (2011). Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through α v β 5 integrin depending on its physical state. *Cell Death Dis.* 2:e153.
40. Yuan B, Xian R, Ma J, Chen Y, Lin C, Song Y. (2012). Isthmin inhibits glioma growth through antiangiogenesis in vivo. *J Neurooncol.* 109:245-252.
41. Jørgensen JR, Thompson L, Fjord-Larsen L, Krabbe C, Torp M, Kalkkinen N, Hansen C, Wahlberg L. (2009). Characterization of Meteorin-An Evolutionary Conserved Neurotrophic Factor. *J Mol Neurosci.* 39:104-116.
42. Tanaka A, Lai-Cheong JE, van den Akker PC, Nagy N, Millington G, Diercks GF, van Voorst Vader PC, Clements SE, Almaani N, Techanukul T, Hide M, South AP, McGrath JA. (2010). The molecular skin pathology of familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Exp Dermatol.* 19:416-423.
43. Watanabe K, Akimoto Y, Yugi K, Uda S, Chung J, Nakamuta S, Kaibuchi K, Kuroda S. (2012). Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length. *J Cell Sci.* 125:2198-2211.
44. Castrillón-Rivera L, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarennnes C. (2008). La Función Inmunológica de la Piel. *Dermatol Rev Mex.* 52:211-224.
45. Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. (2004). New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 113:651-657.

46. Sabin BR, Peters N, Peters AT. (2012). Chapter 20: Atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc.* 33:67-69.
47. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. (2006). Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 118:178-189.
48. Guzik TJ, Bzowska M, Kasprowicz A, Czerniawska-Mysik G, Wojcik K, Szmyd D, Adamek-Guzik T, Pryjma J. (2005). Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy.* 35:448-455.
49. Boguniewicz M, Schmid-Grendelmeier P, Leung Donald YM. (2006). Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 118:40-43.
50. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med.* 361:496-506.
51. Griffiths CE, Barker JN. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 370:263-271.
52. Schön MP, Boehncke WH. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med.* 352:1899-1912.
53. Blauvelt A. (2008). T-Helper 17 Cells in Psoriatic Plaques and Additional Genetic Links between IL-23 and Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 128:1064-1067.
54. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, Krueger JG. (2008). Psoriasis Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells. *J Invest Dermatol.* 128:1207-1211.
55. Gustafson CJ, Watkins C, Hix E, Feldman SR. (2013). Combination therapy in psoriasis: an evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 14:9-25.
56. Johnson-Huang LM, Lowes MA, Krueger JG. (2012). Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. *Dis Model Mech.* 5:423-433.
57. Spuls PI, Hooft L. (2012). Brodalumab and ixekizumab, anti-interleukin-17-receptor antibodies for psoriasis: a critical appraisal. *Br J Dermatol.* 167:710-713.
58. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li

- J, Russell CB, Thompson EH, Baumgartner S. (2012). Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*. 366:1181-1189.
59. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, Braun D, Banerjee S. (2012). Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 366:1190-1199.
60. Vaidya DC, Schwartz RA. (2008). Prurigo nodularis: a benign dermatosis derived from a persistent pruritus. *Acta Dermatovenereol Croat*. 16:38-44.
61. Lee MR, Shumack S. (2005). Prurigo nodularis: A review. *Australas J Dermatol*. 46:211-220.
62. Carrascosa JM, Ferrándiz C. (2001). Estrategias terapéuticas en el prurigo nodular. *Piel*. 16:360-364.
63. Klein-Wiegel P, Opitz C, Riemekasten G. (2011). Systemic sclerosis - a systematic overview: part 1 - disease characteristics and classification, pathophysiologic concepts, and recommendations for diagnosis and surveillance. *Vasa*. 4:6-19.
64. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. (2009). Scleroderma. *N Engl J Med*. 360:1989-2003.
65. Vasquez R, Sendejo C, Jacobe H. (2012). Morphea and other localized forms of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 24:685-693.
66. Kreuter A. (2012). Localized scleroderma. *Dermatol Ther*. 25:135-147.
67. Barnes J, Mayes MD. (2012). Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*. 24:165-170.
68. Nikpour M, Stevens WM, Herrick AL, Proudman SM. (2010). Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 24:857-869.
69. Kuhn A, Sticherling M, Bonsmann G. (2007). Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 5:1124-1137.

70. Choi J, Kim ST, Craft J. (2012). The pathogenesis of systemic lupus erythematosus- an update. *Curr Opin Immunol*. 24:651-657.
71. Pretel M, Marqués L, España A. (2012). Drug-induced Lupus Erythematosus. *Actas Dermosifiliogr*. S0001-7310:451-456
72. Katz U, Zandman-Goddard G. (2010). Drug-induced lupus: an update. *Autoimmun Rev*. 10:46-50.
73. Sharma A, Bialynicki-Birula R, Schwartz RA, Janniger CK. (2012). Lichen planus: an update and review. *Cutis*. 90:17-23
74. Usatine RP, Tinitigan M. (2011). Diagnosis and Treatment of Lichen Planus. *Am Fam Physician*. 84:53-60.
75. Rossi R, Mori M, Lotti T. (2007). Actinic keratosis. Review. *Int J of Dermatol*. 46:895-904.
76. Ko CJ. (2010). Actinic keratosis: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 28:249-253.
77. Salasche SJ. (2000). Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 42:4-7.
78. Sánchez-Ferra D, Alcalá-Pérez D, Peralta-Pedrero ML, Vega-González M, Medina-Bojorquez A, Valenzuela-Flores AB, Torres Arreola LP. (2012). Guía de práctica clínica para diagnóstico y tratamiento de la queratosis actínica. *Dermatol Rev Mex*. 56:14-25.
79. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. (2010). Basal cell carcinoma: what's new under the sun. *Photochem Photobiol*. 86:481-491.
80. Roewert-Hubert J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. (2007) Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 157:47-51.
81. Firnhaber JM. (2012). Diagnosis and treatment of Basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician*. 86:161-168.

82. Alam M, Ratner D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 344:975-983.
83. Garzona-Navas L, Moreira-Hidalgo F, Hidalgo-Matlock B, Siles-Briceño R. (2007). Micosis Fungoide: Revisión de tema y presentación de un caso. *Rev costarric salud pública.* 16:46-53.
84. Beyer M, Möbs M, Humme D, Sterry W. (2011). Pathogenesis of mycosis fungoides. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9:594-598.
85. Zucker-Franklin D, Hooper WC, Evatt BL. (1992). Human lymphotropic retroviruses associated with mycosis fungoides: evidence that human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) as well as HTLV-I may play a role in the disease. *Blood.* 80:1537-1545.
86. Humme D, Lukowsky A, Sterry W. (2010). Diagnostic tools in mycosis fungoides. *G Ital Dermatol Venereol.* 145:375-384.
87. Galper SL, Smith BD, y Wilson LD. (2010). Diagnosis and management of mycosis fungoides. *Oncology (Williston Park).* 24:491-501.
88. Stanley MA. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 25:215-222.
89. Xu Y, Zhu KJ, Zhu N, Jiang DH, Chen XZ, Cheng H. (2009). Expression of Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells and Th1/Th2, Tc1/Tc2 profiles in the peripheral blood of patients with condyloma acuminatum. *Clin Exp Dermatol.* 34:229-235.
90. Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G. (2012). Genital Warts: A comprehensive Review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 5:25-36.
91. Hernández-Zárate SI, Medina-Bojórquez A, López-Tello SAL, Alcalá-Pérez D. (2012). Epidemiología del cáncer de piel en pacientes de la Clínica de Dermatología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. Estudio retrospectivo de los últimos ocho años. *Dermatología Rev Mex.* 56:30-37.

92. Casado-Verrier B, Gómez-Fernández C, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Mingorance-Cruz J, Moreno-Alonso de Celada R, Herranz-Pinto P. (2012). Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Madrid: prevalence study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30:300-306.
93. Menéndez Tuñón S, Sariago Jamardo A, Fernández Tejada E, Fernández García N, López Vilar P, Meana Meana A. (2010). Consultas dermatológicas en Pediatría de Atención Primaria. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 12:41-52.
94. Lowell BA, Froelich CW, Federman DG, Kirsner RS. (2001). Dermatology in primary care: Prevalence and patient disposition. *J Am Acad Dermatol*. 45:250-255.
95. Kilkenny M, Merlin K, Young R. (1998). The prevalence of common skin conditions in Australian school students: 1. Common, plane and plantar viral warts. *Br J Dermatol*. 138:840-845.
96. Ortiz A, Herrera T, Pérez C, del Molino F, Piñeiro M, Perales L y Muñoz P. (1992). Epidemiología de las enfermedades dermatológicas en atención primaria. *Rev Esp Salud Pública*. 66: 71-82.
97. Galán JR. (2002). Problemas dermatológicos en el primer nivel de atención. Práctica diaria de la dermatología en el 1o. y 2o. niveles de atención médica. *Rev Fac Med UNAM*. 45:162-163.
98. Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, Müller A, McClanahan TK, Die-Nosjean MC, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Oldham E, Zlotnik A. (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol*. 164:3465-3470.
99. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. (2008). www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.

100. Wallstrom G, Anderson KS, Labaer J. (2013). Biomarker Discovery for Heterogeneous Diseases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Publicado en línea.
101. Kim YA, Salari R, Wuchty S, Przytycka TM. (2013). Module cover - a new approach to genotype-phenotype studies. *Pac Symp Biocomput*. 18:135-146.
102. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. (2013). A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 32:617-628.
103. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastava G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoo AS, Bernal-Mizrachi L, Mann KP, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon LI, Czader M, Gill JI, His ED, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith LL, Johnson AJ, Byrd JC, Luftig MA, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson D, Dave SS. (2013). Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:1398-1403.
104. Callard R, Gearing A. 2001. The cytokine. *Facts Book. Academic Press*.
105. Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E. (2004). Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and P. *acnes* GroEL. *Br J Dermatol*. 150:421-428.
106. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB, Gorman DM, Smith K, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, McClanahan TK, Bowman EP. (2006). IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med*. 203:2577-2587.
107. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 8:950-957.

108. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Khatcherian A, Bluth MJ, Lowes MA, Krueger JG. (2007). Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med.* 204:3183-3194.
109. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, Alenius H, Dieu-Nosjean MC, Meller S, Rieker J, Steinhoff M, Hoffmann TK, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. (2006). IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 117:411-417.
110. Groneber DA, Serowka F, Peckenschneider N, Artuc M, Grützkau A, Fischer A, Henz BM, Welker P. (2005). Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1. *J Neuroimmunol.* 161:87-92.
111. Raap U, Kapp A. (2005). Neuroimmunological findings in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 5:419-424.
112. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. (2007). Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev.* 6:169-175.

Anexos.

Anexo 1. Lista de abreviaturas.

Abreviatura.	Significado.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario.
AMOP	dominio de adhesión asociado en MUC4 y otras proteínas.
APE	antígeno prostático específico.
ARNm	ácido ribonucleico mensajero.
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia.
ARNr 18S	ácido ribonucleico ribosomal 18S.
BIGE	Índice Corporal de Expresión Génica.
β -ME	β -mercaptoetanol.
CCL20	ligando de quimiocina 20 tipo CC.
CMSP	células mononucleares de sangre periférica.
DE	desviación estándar.
DEPC	dietilpirocarbonato.
Dnasa	desoxirribonucleasa.
FCN	factor de crecimiento nervioso.
FNT- α	factor de necrosis tumoral alfa.
FPLCA	amiloidosis cutánea localizada primaria familiar.
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
IFN- γ	interferón gamma.
IL	interleucina.
ISM	isthmin.
ISM1	isthmin 1.
KLK3	calicreína 3.
LE	lupus eritematoso.
LEC	lupus eritematoso cutáneo.
LED	lupus eritematoso discoide.
LEIM	lupus eritematoso inducido por medicamentos.
LES	lupus eritematoso sistémico.
LUV	luz ultravioleta.
METRIN	meteorin.
METRNL	meteorin-like.
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
PGH	Proyecto Genoma Humano.
PRGC	peptido relacionado al gen de la calcitonina.
RMA	promedio de multichip robusto.
RCP	reacción en cadena de la polimerasa.

RCP-c	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
Rnasa	ribonucleasa.
rpm	revoluciones por minuto.
SNC	sistema nervioso central.
SNP	sistema nervioso periférico.
UR	unidades relativas.
TSP1	dominio trombospondina tipo 1.
VLTH-1	virus linfotrópico T humano tipo 1.
VPH	virus del papiloma humano.

Anexo 2. Carta de consentimiento informado.

Nombre del proyecto:

“COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ISM1 Y METRNL EN PIEL
SANA Y EN ENFERMEDADES DE LA PIEL”

He sido informado acerca de mi participación en el proyecto aquí citado. Estoy consciente que me tomarán una muestra de piel requerida para esta investigación. Se me han explicado todas las dudas acerca de la participación en el estudio, los riesgos y los beneficios. Se me ha asegurado que es libre de costo y que se me informarán de los resultados derivados de los estudios realizados si así lo deseo.

De manera voluntaria acepto participar, y se me garantiza la confidencialidad de la investigación.

Nombre y firma del paciente o representante legal:

Nombre y firma del investigador:

Nombre y firma, testigo I:

Nombre y firma, testigo II:

Fecha: _____

Anexo 3. Técnica de aislamiento de ARN total.

De acuerdo con el protocolo RNeasy Mini Kit para purificación de ARN total de tejidos de origen animal (Qiagen, Alemania).

1. Homogeneización del tejido:
 - Añadir 10 μ L de β -mercaptoetanol (β -ME) (Sigma-Aldrich, Alemania) por cada mL de amortiguador RLT para la lisis de tejidos y células (Qiagen, Alemania).
 - Agregar 600 μ L del amortiguador RLT a las muestras colocadas en tubos Falcon de 5 mL.
 - Homogeneizar las muestras utilizando el homogeneizador de tejidos, Polytron PT 2500 E (Kynematica AG, Lucerna, Suiza), a una velocidad de 23,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 a 60 segundos.
 - Mantener las muestras en hielo.
2. Del volumen total de cada muestra lisada resultado de la homogeneización, tomar 700 μ L como máximo y colocarlo en las columnas de centrifugación QIAshredder que están incorporadas en tubos de colección de 2 mL. Centrifugar 2 minutos a una velocidad de 13,000 rpm.
3. Transferir el eluido a tubos de 1.5 mL y centrifugar por 3 minutos a una velocidad de 13,000 rpm.
4. Transferir el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta a nuevos tubos de 1.5 mL, agregar 600 μ L de etanol al 70% y mezclar pipeteando.

La mezcla resultante será de aproximadamente 1.3 mL (sobrenadante + etanol).

5. Tomar 700 μ L de esta mezcla y colocarlos en las minicolumnas RNeasy que están incorporadas en tubos de colección de 2 mL. Centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm. Desechar el primer eluido de los tubos de colección.

6. Colocar el volumen restante de la mezcla (aproximadamente 600 μ L) en las mismas minicolumnas RNeasy incorporadas en tubos de colección y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm. Desechar el segundo eluido de los tubos de colección.
7. Agregar 700 μ L del amortiguador RW1 a las minicolumnas RNeasy para lavar la membrana donde se adhiere el ARN y centrifugar 15 segundos a 10,000 rpm. Desechar el eluido y los tubos de colección.
8. Transferir las minicolumnas RNeasy a nuevos tubos de colección de 2 mL. Adicionar 500 μ L del amortiguador RPE a las minicolumnas para un segundo lavado de membrana y centrifugar 15 segundos a 10,000 rpm. Desechar el eluido de los tubos de colección.
9. Agregar 500 μ L del amortiguador RPE a las minicolumnas, centrifugar 2 minutos a 10,000 rpm. Desechar el eluido y los tubos de colección.
- 9^a. Opcional, para un mejor secado de la membrana donde se adhiere el ARN: colocar las minicolumnas RNeasy en nuevos tubos de colección de 2 mL y centrifugar un minuto a 13,000 rpm. Posterior a la centrifugación desechar los tubos de colección.
10. Transferir las minicolumnas RNeasy a tubos estériles de 1.5 mL, agregar 50 μ L de agua libre de RNasa y centrifugar un minuto a 10,000 rpm.
11. Repetir el paso 10 con un segundo volumen de agua libre de RNasa, centrifugar un minuto a 10,000 rpm. Para obtener mayor concentración de ARN total, usar el eluido del paso 10. Se tendrá 15-30% menor volumen pero se obtendrá mayor concentración de ARN total.
12. Desechar las minicolumnas RNeasy.
13. Congelar el eluido resultante a -80°C hasta que se realice la cuantificación de ARN total.

Realizar los pasos de centrifugación en una microcentrífuga estándar a temperatura ambiente (25°C).

Anexo 4. Técnica de cuantificación de ARN total.

Utilizando el NanoDrop 2000/2000C (Thermo Scientific).

1. Abrir en la computadora el programa NanoDrop 2000/2000C y seleccionar la opción 'Nucleic Acid', y posteriormente la opción 'RNA'.
2. Abrir la plataforma en el NanoDrop, colocar 1.2 μ L de agua, cerrar cuidadosamente la plataforma y presionar la opción en el programa de la computadora '*blank solution*'.
3. Abrir la plataforma y limpiar con un papel absorbente (Kimwipes, Kimberly-Clark).
4. Colocar 1.2 μ L de la muestra en la plataforma, cerrar y presionar en la computadora la opción '*measurement*'.
5. Abrir la plataforma y limpiar con un papel absorbente (Kimwipes, Kimberly-Clark).
6. Repetir pasos 4 y 5 hasta finalizar de cuantificar las muestras.

La pureza del ARN deberá evaluarse con la relación de absorbancia del ARN a 260/280 nanómetros. Se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de absorbancia indican ARN de buena calidad.

Anexo 5. Técnica de síntesis de ADN complementario (ADNc).

1. Utilizar 4 µg de ARN total en un volumen final de 10 µL de agua tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) (Carl Roth, Alemania).
2. Preparar la mezcla A en las siguientes cantidades:
 - 1.5 µL de amortiguador de la primera hebra 5X (250 mM de hidrocloreuro de Tris, pH 8.3 a temperatura ambiente, 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂; Invitrogen).
 - 1 µL de inhibidor de RNasa/Rnasin (40 U/µL; Promega).
 - 1 µL de desoxirribonucleasa I (DNasa I) recombinante, libre de RNasa (10 U/µL; Roche).
 - 2.5 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Carl Roth, Alemania).
3. Agregar 6 µL de la mezcla A a los 10 µL de ARN total, mezclar con la pipeta y realizar una centrifugación breve.
4. Incubar los tubos durante 20 minutos a 37°C y 10 minutos a 70°C, en el programa - 0 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).
5. Preparar la mezcla B en las siguientes cantidades:
 - 1 µL de oligodesoxitimidilato (0.5 µg/µL; Invitrogen).
 - 0.4 µL de hexámero aleatorio (252.2 µM; Promega).
 - 2.6 µL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).
6. Agregar 4 µL de la mezcla B a cada muestra, mezclar con la pipeta y realizar una centrifugación breve.
7. Incubar las muestras durante 10 minutos a 70°C en el programa -1 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).
8. Preparar la mezcla C en las siguientes cantidades:
 - 4.5 µL del amortiguador de la primera hebra (5X; Invitrogen).
 - 1.5 µL de desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (10 mM; Bioline).
 - 1 µL de ditiotritol (0.1 M; Invitrogen).

- 0.5 μL unidades de inhibidor de RNasa/Rnasin (40 U/ μL ; Promega).
 - 1.5 μL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).
9. Agregar 9 μL de la mezcla C a cada muestra, mezclar con la pipeta y realizar una centrifugación breve.
 10. Incubar las muestras durante 2 minutos a 42°C en el programa -2 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).
 11. Agregar 1 μL de transcriptasa reversa (200 U/ μL ; Invitrogen) a cada muestra, mezclar con la pipeta y realizar una centrifugación breve con lo que se obtiene un volumen final de reacción de 30 μL .

En términos de concentración por tubo equivale a: 1X del amortiguador de la primera hebra (50 mM de hidrocloreuro de Tris, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl_2), 2 U/ μL del inhibidor de RNasa/Rnasin, 0.33 U/ μL de DNasa I recombinante, 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de oligodesoxitimidilato, 3.3 μM de hexámero aleatorio, 500 μM de desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato y 3.3 mM de ditiotritol.

12. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción incubar las muestras durante 50 minutos a 42°C y posteriormente 10 minutos 70°C en el programa -3 del termociclador Biotron Trio (Biometra, Alemania).
13. Al final de la reacción de amplificación ajustar la concentración de ADNc a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
14. Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RCP-c), ajustar el ADNc a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y congelar -20°C hasta ser utilizado.

Anexo 6. Técnica de RCP-c.

1. Preparar la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen ARNr 18S:
 - 12.5 μL de la mezcla maestra de RCP universal TaqMan (2X; Applied Biosystems).
 - 0.15 μL del cebador hacia delante del gen ARNr 18S (10 μM ; Life Technologies).
 - 0.15 μL del cebador hacia atrás del gen ARNr 18S (10 μM ; Life Technologies).
 - 0.15 μL de la sonda del gen ARNr 18S (40 μM ; Life Technologies).
 - 2.05 μL de agua tratada con DEPC (Carl Roth, Alemania).
2. Colocar 15 μL de la mezcla y 10 μL del ADNc (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems).

El volumen final de la reacción será de 25 μL que en términos de concentración equivale a: 1X de la mezcla maestra de RCP universal TaqMan, 0.06 μM del cebador hacia delante del gen ARNr 18S, 0.06 μM del cebador hacia atrás del gen ARNr 18S y 0.24 μM de la sonda del gen ARNr 18S.

3. Cubrir la placa con una cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), sellando la cubierta con un aplicador; nunca tocarla con las manos.
4. Centrifugar la placa durante 2 minutos a 1,200 rpm.
5. Colocar en un termociclador para RCP-c.
6. Preparar la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen ISM1:
 - 12.5 μL de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green (2X; Applied Biosystems).
 - 2.5 μL de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen ISM1 (2 μM ; Eurofins MWG).
7. Colocar 15 μL de la mezcla y 10 μL del ADNc (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems).

El volumen final de la reacción será de 25 μL que en términos de concentración equivale a: 1X de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green y 0.2 μM de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen ISM1.

8. Cubrir la placa con una cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), sellando la cubierta con un aplicador; nunca tocarla con las manos.
9. Centrifugar la placa durante 2 minutos a 1,200 rpm.
10. Colocar en un termociclador para RCP-c.
11. Preparar la siguiente mezcla para la cuantificación de la expresión del gen METRNL:
 - 12.5 μL de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green (2X; Applied Biosystems).
 - 2.5 μL de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen METRNL (2 μM ; Eurofins MWG).
12. Colocar 15 μL de la mezcla y 10 μL del ADNc (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada muestra en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp Optical para RCP-c (Applied Biosystems).

El volumen final de la reacción será de 25 μL que en términos de concentración equivale a: 1X de la mezcla maestra de RCP universal SYBR Green y 0.2 μM de la mezcla de cebadores hacia delante y hacia atrás del gen METRNL.

13. Cubrir con cubierta de adhesivo óptico (Applied Biosystems), sellando la cubierta con un aplicador; nunca tocarla con las manos.
14. Centrifugar la placa durante 2 minutos a 1,200 rpm.
15. Colocar en un termociclador para RCP-c.

Finalmente, se deberá dividir la expresión del gen ISM1 entre la expresión del gen ARNr 18S y la expresión del gen METRNL entre la expresión del gen ARNr 18S. Los valores obtenidos se toman como la cuantificación relativa de los genes ISM1 y METRNL en las muestras estudiadas y se representan como unidades relativas (UR).