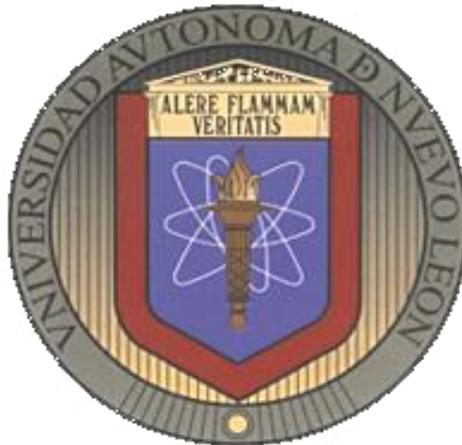


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**“Detección de mutaciones en el Gen *EDA1* en pacientes mexicanos con
Displasia Ectodérmica ligada al cromosoma X”**

PRESENTA:

JULIO CESAR SALAS ALANIS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

MONTERREY, N.L. Octubre 2014

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**“Detección de mutaciones en el Gen *EDA1* en pacientes mexicanos con
Displasia Ectodérmica ligada al cromosoma X”**

PRESENTA:

JULIO CESAR SALAS ALANIS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

MONTERREY, N.L. Octubre 2014

**“Detección de mutaciones en el Gen *EDA1* en pacientes mexicanos con
Displasias ectodérmicas ligada al cromosoma X”**

Aprobación de la tesis:

**Ph. D. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Director de la tesis**

Dr. med. Rodrigo Elizondo Omaña

Dr. med. Roberto Montes de Oca Luna

Dra. C. María Lourdes Garza Rodríguez

**Dr. med. Gerardo Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

Asesores

Dr. Jorge Ocampo-Candiani

MSP César Luna Gurrola

Asesor Externo Nacional

Dra. Carola Durán
Instituto Nacional de Pediatría
Ciudad de México.

Asesores Externos Internacionales

Ph.D Angela M Christiano
Departments of Dermatology and Genetics & Development
Columbia University, NewYork, US.

Ph.D. David Kelsell
The Genome Center & The Royal Hospital of London, UK.

Ph.D. Keith Choate
Departments of Dermatology and Pathology
Medicine School Yale University.

“Detección de mutaciones en el Gen *EDA1* en pacientes mexicanos con Displasia ectodérmica ligada al cromosoma X”

Presentado por:

Médico Especialista en Dermatología Dr. Julio César Salas Alanis.

Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en el servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el Departamento de Dermatología de la Universidad de Yale en New Haven, Connecticut, Estados Unidos Americanos y en el Centro Genómico de la Facultad de Medicina y Odontología del Instituto Blizzard, Instituto Barts y el Hospital Royal de Londres en Inglaterra, bajo la dirección del Ph. D. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis doctoral en especial a mi núcleo familiar integrado por Mine, Mauricio, Diego y Andrés, quienes han permanecido a mi lado y han sido mi motivo de seguir adelante cada día. Ellos son el regalo más hermoso que me ha brindado la vida. Con mucho amor y admiración a mis padres, quienes siempre me han apoyado para dar lo mejor de mí a mis semejantes. Su vida ejemplar ha sido mi mejor guía a seguir. A mis profesores de Dermatología, iniciando por el Profesor Don Juventino González Benavides quien me impulsó a realizar la especialidad en la Ciudad de Guadalajara, a Don José Barba Rubio, quien me enseñó que para ser exitoso se necesita ser más astuto que inteligente. En especial al Sabio, Profesor, Maestro, Genio culto y mi amigo del alma Dr. Don Amado González, quien me impulsó a salir del país e irme a Europa con la franca idea de cultivarme y ver el mundo desde otra perspectiva. Gracias Amado, fuiste un parte aguas en mi vida. A Don Luciano Domínguez Soto, académico de corazón quien amablemente me sacó del anonimato invitándome a ser visto en México como un Dermatólogo Investigador en Enfermedades Ampollosas Autoinmunes y Genéticas.

A mi querido guía de la “vida sencilla pero con estilo”, Dr. Roberto Arenas, quien fue mi primer acicate mexicano para publicar y no dejar nada en el cajón. Con él a un lado, uno crece como persona, como academia y sobre todo, se aprende que la vida también es para parrandear. Al Dr. Jorge Ocampo Candiani quien me brindó la oportunidad más fascinante de mi vida: de cumplir con mi sueño de ser Profesor de Dermatología del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”. La espera fue larga y duró muy poco, pero extremadamente reconfortante y productiva, gracias Jorge, cumpliste mi deseo.

A mis compañeros del Doctorado; Mine, Checo y Maira, con quienes fue una delicia volver a las aulas y sentirme alumno; rejuvenecí, sufrí, pero a la vez aprendí mucho de cada uno de Ustedes y de mis maestros de doctorado.

A mis mejores alumnos Rodrigo Cepeda, Rodrigo Valdés, Kristian Eichelman, Martha García y en especial a Giulio Fortuna, mi primer alumno extranjero.

A mis tutores extranjeros Juan Ferrando, Martin M. Black, Balbir Bhogal, Richard Barlow, Jemima Mellerio, Andy South, Dedee Murell, Peter Marinkovici, Jouni Uitto, David Kelsell, Charles Mei, Eva Wozniak, y Keith Choate.

A mi eterna amiga Angela Christiano, quien me invitó a conocer el intrigante mundo del pelo y sus genes.

A mi hermano, tutor y amigo John McGrath con quien he compartido parte de mi vida familiar y sobre todo por esta odisea infinita llamada investigación en Genodermatosis. Sin tí no hubiera conocido las epidermólisis bullosas ni a los pacientes que amablemente nos mantienen los pies en la tierra, gracias John por confiar en mi... muchas gracias.

A mi director de tesis y amigo Hugo Barrera y mis co-directores, Lourdes Garza, Rodrigo Omaña, Roberto Montes de Oca y Jorge Ocampo, César Luna, quienes acaban de formarme como un verdadero investigador científico.

A los pacientes con Displasias Ectodérmicas, quienes amablemente aceptaron participar en este hermoso proyecto. A Karla Padilla Fundadora de la Asociación Mexicana de Displasias Ectodérmicas y a mi querida amiga Carola Durán, quien me apoyó incondicionalmente en este proyecto.

Finalmente a ti Dios, donde quieras que estés, gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN.....	15
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.....	17
2.1 Características generales.....	17
2.2 Manifestaciones Cínicas.....	18
2.3 Epidemiología.....	28
2.4 Diagnóstico.....	29
Capítulo III	
3. IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD.....	30
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos particulares.....	33
Capítulo V	
5. HIPÓTESIS	34
5.1 Hipótesis de trabajo.....	34
5.2 Hipótesis nula.....	34
Capítulo VI	
6. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	34
6.1 TIPO DE ESTUDIO.....	36

Capítulo VII	Página
7. METODOLOGÍA.....	36
7.1 Obtención de información clínica.....	36
7.2 Obtención del consentimiento informado.....	36
7.3 Obtención de imágenes fotográficas y muestras de sangre y saliva.....	36
7.4 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE DNA.....	37
7.4 DE SALIVA	
7.5 DE SANGRE	
Capítulo VIII	
8. RESULTADOS.....	47
Capítulo IX	
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
Capítulo X	
10. DISCUSIÓN.....	64
Capítulo XI	
11. CONCLUSIÓN.....	67
Capítulo XII	
12.1 ANEXOS.....	71
12.1 Carta de Consentimiento.....	71

12.2	E-mail de confirmación de aceptación del artículo.....	82
12.3.	Galera de artículo aceptado.....	83
12.4	Constancias de conferencias del tema.....	91
12.5	Imágenes del recuerdo y proceso de la tesis.....	96
12.6	Biografía.....	101
Capítulo XIII		
13	Bibliografía	102

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Grupo 1 de las Displasias Ectodérmicas	10
2. Grupo 2 de las Displasias Ectodérmicas	20
3. Pares de Primers del gen <i>EDA1</i>	25
4. Manifestaciones clínicas de pacientes y portadoras de DEH-X.....	30
5. Manifestaciones clínicas de pacientes y madres negativos a DEH-X.	40
6. Resultados de las mutaciones en el gen <i>EDA1</i>	45

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Eje ectodisplasia y ciclo NK-kB.....	20
2. Características clínicas típicas de pacientes con DEH.....	23
3. Dibujo de los exones, aminoácidos y dominios de la proteína ectodisplasia	24
4. Características clínicas de las portadoras del gen mutado <i>EDA1</i>	25
5. Similitudes clínicas de pacientes con DEH	31
6. Estrategia general del protocolo	37
7. Gel de Agarosa y los productos de la RCP	41
8. Secuenciadora de ADN 373xL.....	42
9. Patrón de herencia recesivo ligado al X	43
10. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 1.....	45
11. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 2.....	46
12. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 3.....	47
13. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 4.....	48
14. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 5.....	49
15. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 6.....	50

16. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 7.....	51
17. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 8.....	53
18. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 9.....	54
19. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 10.....	55
20. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 11.....	57
21. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 12.....	58
22. Árbol genealógico, imágenes clínicas y electroferograma de la familia 13.....	59
23. Dominios de la proteína ectodisplasina y sus respectivas mutaciones del gen <i>EDA1</i>	64
24. Proteína ectodisplasina y sus mutaciones conocidas e inéditas.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- DE: Displasia Ectodérmica.
- DEH: Displasia Ectodérmica Hipohidrótica.
- EDA*: Gen de la proteína ectodisplasina.
- EDAR*: Gen del receptor de la proteína ectodisplasina.
- EDARADD: Gen del dominio muerto asociado al receptor de la ectodisplasina.
- DEH-X: Displasia Ectodérmica Hipohidrótica ligado al Cromosoma X.
- DEH-AR: Displasia Ectodérmica Hipohidrótica Autosómica Recesiva.
- DEH-AD: Displasia Ectodérmica Hipohidrótica Autosómica Dominante.
- FNT: Factor de necrosis tumoral.

Julio César Salas Alanis

Fecha de obtención de grado _____ 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**“Detección de mutaciones en el Gen EDA1 en pacientes mexicanos
con Displasia Ectodérmica ligada al cromosoma X”**

Candidato para obtener el grado de Doctorado en Medicina

Área de estudio: Dermatología-Genética

CAPITULO I

RESUMEN

La definición de Displasias Ectodérmicas (DE) según Freire-Maia consiste en un grupo de enfermedades congénitas caracterizadas por alteraciones en dos o más estructuras derivadas del ectodermo: pelo, dientes, uñas y/o glándulas sudoríparas¹.

Se han descrito alrededor de 200 formas diferentes de DE, de las cuales, solo el 62 clínicamente bien diferenciadas se han identificado alrededor de 64 genes en 3 regiones cromosómicas. La incidencia es de un caso por cada 17,000 nacidos vivos y pueden ser heredados por cualquiera de los posibles patrones de herencia mendeliana.

Las DE que afectan las glándulas sudoríparas se les llama hipohidróicas /anhidróicas (DEH) de acuerdo a la cantidad de sudoración que se produce. Inicialmente fueron descritas por Thurman en 1848 y posteriormente en 1875 Charles Darwin describió el patrón de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Posteriormente en 1913 Christ las catalogó como un trastorno congénito del ectodermo. Siemens reafirmó el vínculo ligado al cromosoma X y finalmente Weech acuñó el término de Displasia Ectodérmica Hipohidróica ligada al X en 1929².

Las mutaciones de sólo 4 genes (EDA1, EDAR, EDARADD y WNT10A) son las responsables de la mayoría de los casos de DEH y es importante mencionar que la mutación en cualquiera de los genes mencionados provoca un fenotipo idéntico, lo cual hace imposible saber en los casos de solo hijos varones enfermos si corresponden a patrón de herencia ligada al X o bien a uno autosómico recesivo³.

La DEH ligada al cromosoma X (DEH-X) representa la forma clínica más común (90% de los casos) y se debe a mutaciones del gen de la ectodisplasia *EDA1*. Los pacientes pueden presentar hipotricosis con cabello fino y difuso en piel cabelluda y cuerpo, disminución en la sudoración y dientes cónicos o hipoadontia. La triada característica es cabello fino o delgado, adontia y ausencia o disminución de la sudoración.

Los pacientes con DEH al nacer presentan fiebres intermitentes de origen a determinar ocasionando en ocasiones convulsiones y muerte. Así mismo se ha descrito una incidencia de 5-10% de retraso mental, ocasionada por las fiebres y convulsiones.

Las madres portadoras presentan síntomas menores o cambios en la piel y/o anexos mínimos. Un ejemplo de manifestaciones en una madre portadora sería cabello delgado, parches de hipohidrosis o dientes cónicos y/o ausencia de una o más piezas dentarias, escaso cabello o bien parches de sudoración corporal.

Ya han sido reportadas las diferentes mutaciones que afectan al gen *EDA1* en algunos países, incluyendo México. Estas pueden ser mutaciones del tipo sin sentido, deleciones e inserciones, entre otras⁴⁻⁵.

El propósito de esta tesis consistió en analizar a varones mexicanos con DEH y establecer por estudios del árbol familiar su herencia, así como confirmar el diagnóstico clínico, diferenciar a las mujeres sanas de las portadoras y sobre todo dar asesoría genética para los posibles embarazos.

Analizamos 20 familias con DEH, en las cuales había solo varones afectados, realizamos detecciones de mutaciones del gen *EDA* de acuerdo a los métodos preestablecidos previamente. En 20 familias con DEH, encontrando mutación del gen en 13 familias (65%) de ellas. Diez diferentes mutaciones fueron encontradas, 6 inéditas y 4 ya publicadas previamente, dos de ellas de tipo de codón de terminación prematuro y el resto son mutaciones de sentido equivocado.

Estos resultados confirman el tipo de herencia en nuestra población mexicana, así mismo se demostró que no existe correlación genotipo-fenotipo y finalmente son una ayuda para prevenir en futuros embarazos muerte por fiebre en los recién nacidos con esta entidad.

CAPITULO II

2 INTRODUCCIÓN

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Historia de la DE.

La historia de los primeros casos de DE se remontan a 1792. En 1848 Thurman definió la displasia ectodérmica anhidrótica (DEA) como una entidad independiente. Posteriormente en 1875 Wedderhorn y Charles Darwin publicaron una familia de 4 generaciones con 10 hombres afectados, llamando la atención de ausencia de la enfermedad en las mujeres. Todos los pacientes mostraban 4 pequeños dientes cónicos, escaso pelo corporal y tendencia a la calvicie a edades tempranas; además de sufrir durante los climas cálidos por una resequedad excesiva de la piel. Ellos no heredaban la enfermedad a sus hijos varones.

Debido a que sólo se han podido esclarecer las causas genéticas en 62 formas de todas las DE de alrededor 200, una acertada clasificación no ha sido aun publicada¹⁻².

Clasificación de las Displasias.

En Marzo de 2008 se realizó la primera Conferencia Internacional de la Clasificación de DE en Charleston USA con el propósito de iniciar un consenso para su clasificación.

La clasificación más aceptada es la propuesta por Freire-Maia quien las divide en dos categorías:

El grupo A con once subgrupos de acuerdo a las estructuras involucradas.

1-2-3-4 (cabello-dientes-uñas-glándulas sudoríparas);

1-2-3 (cabello-dientes-uñas);

1-2-4 (cabello-dientes-glándulas sudoríparas);

1-3-4 (cabello-uñas-glándulas sudoríparas);

2-3-4 (dientes-uñas-glándulas sudoríparas);

1-2 (cabello-dientes);

1-3 (cabello-uñas);

1-4 (cabello-glándulas sudoríparas);

2-3 (dientes-uñas);

2-4 (dientes-glándulas sudoríparas);

3-4 (uñas-glándulas sudoríparas).

El grupo B se clasifica con los mismos criterios en cuatro grupos, agregando el número 5 al final para indicar alguna otra alteración del ectodermo presente: 1-5, 2-5, 2-5 y 4-5. Estas otras estructuras del ectodermo involucradas pueden ser: glándulas mamarias, timo, glándula tiroides, porción anterior de la glándula pituitaria, médula adrenal, sistema nervioso central, oído externo, melanocitos, cornea, conjuntiva, glándula y conducto lagrimal y, finalmente, las glándulas de Meibomio. Cabe mencionar que algunas DE por definición a menudo son excluidas de esta clasificación: por ejemplo, la paquioniquia congénita, incontinencia pigmenti y disqueratosis congénita².

Existen otras clasificaciones propuestas por Priolo *et al* en el año 2000 en las cuales utilizan la biología molecular como punto de base. Sin embargo y debido a que la mayoría de las DE no han sido aún descubiertas, será necesario esperar a encontrar todos los genes que causan estas enfermedades³⁻⁶.

Finalmente en el año 2009, basándose en los aspectos clínicos y genéticos, Priolo propone una clasificación clínico-funcional.⁶

Durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, la formación de las capas de mesodermo, endodermo y ectodermo es crucial para la diferenciación de tejidos, es en esta crucial etapa cuando las células del ectodermo reciben instrucciones de ciertos genes (*EDA1*, *EDARD*, *EDARADD* y *WNT10*) para realizar las primeras formaciones de lo que serán los folículos pilosos, glándulas sudoríparas, uñas y demás anexos, así como los dientes a través del eje ectodisplasia, receptor de la ectodisplasia y dominio muerto (Figura 1).

Al presentar mutaciones a cualquiera de los cuatro genes arriba señalados, estos no podrán enviar la señalización de diferenciación de los anexos y por lo tal, la formación de dichos tejidos estará disminuida o totalmente ausente, como en el caso de las glándulas sudoríparas en donde pueden existir algunas (DE hipohidrótica) o presentar la ausencia total de las mismas (DE anhidrótica)^{7,8}.

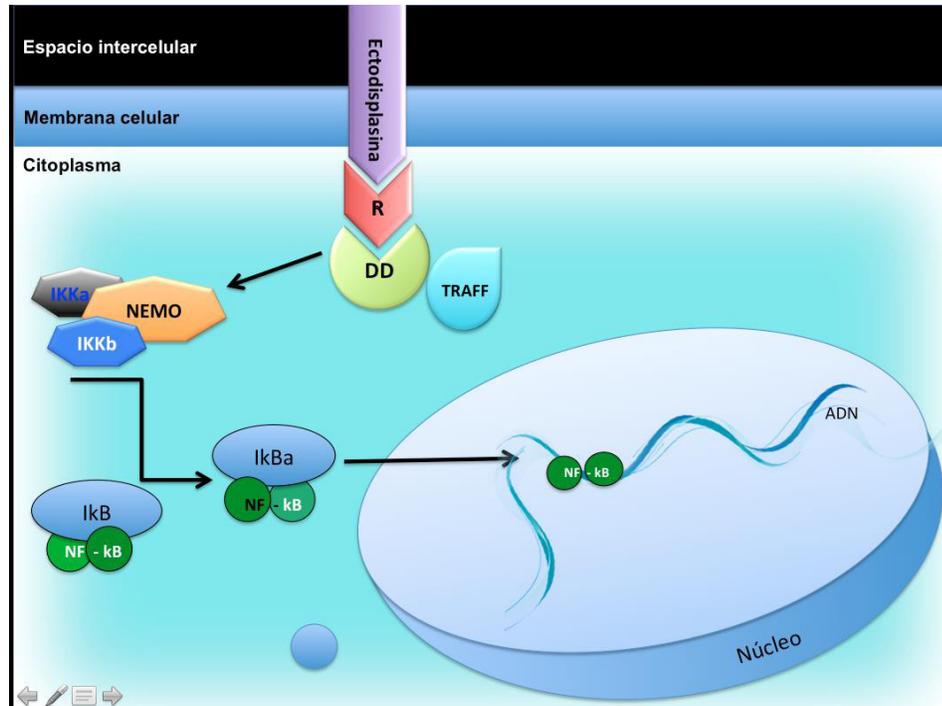


Figura 1. El ciclo NK-kB es necesario para la diferenciación de los tejidos derivados del ectodermo. Todo inicia con la activación del ciclo IKK alfa y beta. Si alguna proteína del eje ectodisplina, receptor de la ectodisplina (R), y/o su dominio muerto (DD) es disfuncional por mutación en sus respectivos genes (*EDA1*, *EDAR*, *EDARADD*), un fenotipo de Displasia Ectodérmica Hipohidrótica se manifestará.

GRUPO 1

Trastorno en donde se puede reconocer un defecto en la interacción del ectodermo y mesénquima.

- 1) Mecanismo de alteración en las vías de señalización que modulan la actividad de la molécula factor nuclear kappa beta (NF-kB) (vía de la señalización ectodisplasina: *EDA1/EDAR/EDARADD* y vía de regulación *NEMO*).
- 2) Alteración de reguladores de la transcripción y/o de la expresión de genes, como *p63*, *DLX3*, *MSX1*, *EVC2* y *EVC*.

Clínicamente, resulta un fenotipo con hipo/aplasia de los derivados ectodérmicos (tabla 1).

Tabla 1 Trastornos del grupo 1

Alteraciones en las vías de señalización que modulan la actividad de NF-kB						
Vía	Gen	Locus	Proteína	Enfermedad	OMIM	Modo de herencia
Vía de señalización de la ectodisplasina-EDAR -EDARRADD	ED-1	Xq12-q13	Ectodisplasina	Displasia ectodérmica anhidrótica	305100	LX
	EDAR	2q13	EDAR	Displasia ectodérmica anhidrótica	129490	AD
				Displasia ectodérmica anhidrótica	224900	AR
	EDARADD	1q42-2-q.43	Death domain asociado a EDAR	Displasia ectodérmica anhidrótica	229400	AR
Vía de regulación NEMO	NEMO / IKK γ	Xq28	Factor nuclear NF-kB	Incontinencia pigmenti	308300	LX
				Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia	300291	LX
	IkB α	14q13	IkB α	Displasia ectodérmica anhidrótica con osteopetrosis e inmunodeficiencia	300301	LX
				Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia	164008	AD
Alteración de reguladores de la transcripción/expresión de genes						
Gen	Locus	Proteína	Enfermedad	OMIM	Modo de herencia	
p63	3q27	P63	Síndrome EEC	604292	AD	
			Síndrome AEC	106260	AD	
			Síndrome ADULT	103285	AD	
			Síndrome <i>limb-mammary</i>	603543	AD	
			Síndrome de Rapp-Hodgkin	603543	AD	
DLX3	17q21	DLX3	Síndrome trico-dento-óseo	190320	AD	
MSX1	4p16.1	MSX1	Enfermedad de Witkop	189500	AD	
EVC2	4p16	EVC2	Síndrome Ellis-Van-Creveld	225500	AR	
EVC	4p16	EVC	Disostosis acrodental de Weyers	193530	AD	
			Síndrome Ellis-Van-Creveld	225500	AR	

GRUPO 2

Trastornos en los que existe una función anormal de una proteína estructural localizada en la membrana celular, como la nectina, las conexinas o la placofilina, cuyos papeles de adhesión y comunicación intercelular es crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular, control del crecimiento y el desarrollo. Ejemplos de este grupo corresponden a queratodermia palmoplantar con o sin afectación de epitelios altamente diferenciados como el de la cóclea o el de la retina, que se traducen en sordera o distrofia de la retina (tabla 2)^{1, 7, 8, 9}.

Tabla 2 Trastornos del grupo 2

Gen	Locus	Proteína	Enfermedad	OMIM	Modo de herencia
GJB6	13q12	Conexina 30	Síndrome de Clouston	129500	AD
PVRL1	11q23-q24	Nectina 1	Displasia ectodérmica con labio/paladar hendido	255060	AD
PKP1	1q32	Placofilina 1	Displasia ectodérmica-síndrome de fragilidad cutánea	604536	AR
CDH3	16q22.1	Cadherina 3	Displasia ectodérmica con ectrodactilia y distrofia macular	225280	AR
WNT10A	2q35	Wnt10A	Displasia odonto-onico-dérmica	257980	AR

Modificada de Priolo M². AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*.

2.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS DISPLASIAS ECTODÉRMICAS HIPOHIDRÓTICAS.

Los términos de Displasias Ectodérmicas Hipohidróticas (DEH) y la forma Anhidrótica (DEA), se utilizan como sinónimos y representan una genodermatosis caracterizada por la tríada de hipotricosis, adontia o hipoadontia, y disminución o inhabilidad para sudar (Figura 2).



Figura 2. Características típicas de la DEH. A) Dientes cónicos, B) cabello escaso y delgado C) facies características, nariz deprimida, labios gruesos, hiperpigmentación pedicular y ausencia de cejas, D) ausencia de glándulas en la región tenar de la mano.

Las DEH muestran desarrollo anormal de las glándulas sudoríparas, cabello, dientes y uñas. Estas son causadas en el 90% de los casos por mutaciones que afectan a únicamente cuatro genes: EDA, EDAR, EDARADD WNT10¹⁰.

1) **Gen EDA1** (de la ectodisplasia) causante de la forma ligada al cromosoma X

(DEH-X).

La DEH-X representa la forma más común de las Displasias Ectodérmicas (MIM# 305100), resulta de mutaciones en el gen *EDA1*, el cual está localizado en el cromosoma Xq12-q13.1, conformado por 9 exones y codificante de la proteína ectodisplasia A (MIM# 300451) .

La ectodisplasia A está constituida por 391 aminoácidos es una proteína transmembranal tipo II que es miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (FNT) y que cuenta con varios dominios: el extracelular o transmembrana, furina, colágena y finalmente el que corresponde al factor de necrosis tumoral¹¹.

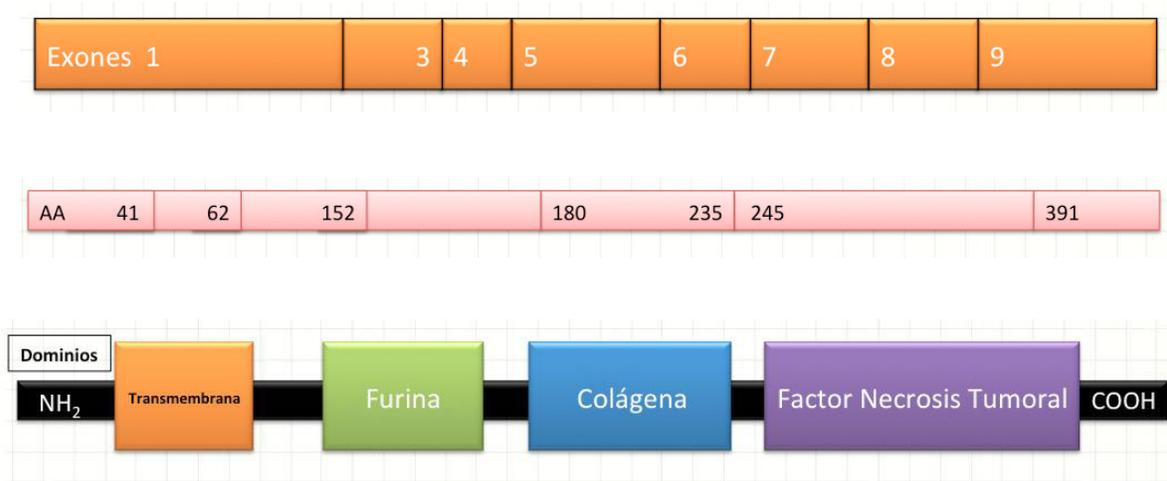


Figura 3. Esquema representativo de la proteína ectodisplina, nueve exones componen el gen *EDA1*, los cuales codifican para 391 aminoácidos que forman los dominios de la proteína ectodisplina: transmembrana, furina, colágena y factor de necrosis tumoral.

- 2) **Gen *EDAR*** (del receptor de la proteína ectodisplina). Se localiza en el cromosoma 2q11q13 (MIM# 604095) y codifica para una proteína de 448 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral. Contiene una región extracelular, una región transmembranal y un dominio muerto en su región intracelular. Tiene 12 exones y se le han descrito alrededor de 40 mutaciones sobre todo en pacientes con las formas autosómicas recesivas.
- 3) **Gen *EDARADD*** (gen de dominio muerto asociada al receptor). Se localiza en 1q-42-q43 (MIM# 606603). El dominio extracelular del gen *EDARADD* es esencial para ligarse a *EDA1*, mientras que el dominio muerto de la región intracelular desempeña un papel importante para el inicio de la señalización de la transducción que conduce a la *apoptosis*. Este gen está involucrado con las formas autosómicas dominantes. Es importante mencionar que las formas ligadas al X y las autosómicas dominantes y autosómicas recesivas son clínicamente indistinguibles entre sí¹².

4) **El Gen *WNT10A***, localizado en el cromosoma 2q35, (MIM# 257980) fue reconocido recientemente como el posible responsable de varias formas autosómicas recesivas incluyendo el Síndrome Schöpf-schulz-Passarge y la Displasia Ónico-Odonto-Dérmica. La familia del gen WNT consiste en genes que han sido implicados en oncogénesis y varios procesos del desarrollo durante la embriogénesis¹⁰.

2.3 Manifestaciones Clínicas.

La DEH-X tiene múltiples manifestaciones clínicas, sin embargo debido al patrón de herencia ligado al cromosoma X, los varones afectados van a manifestar todas o la mayor parte de las características de la enfermedad y las mujeres son a lo mucho portadoras con pocas o nulas características clínicas tales como ausencia de dientes o la presencia de uno o varios dientes cónicos, incluso cabello delgado o ausencia de la cola de la ceja (Figura 4)¹⁴.



Figura 4. Características clínicas de madres portadoras de mutaciones en el gen *EDA1*.

- a) escasa o ausencia cola de ceja y b) diente cónico, son signos comunes en las portadoras de mutaciones en el gen *EDA1* de la enfermedad Displasia Ectodérmica Hipohidrótica ligada al cromosoma X.

El fenotipo de la enfermedad se caracteriza invariablemente por afectar el pelo, los dientes y las glándulas ecrinas, dando como resultado la siguiente triada: 1. Alopecia /Hipotricosis: El cabello es delgado, escaso y color claro. Ausencia parcial o total de cejas y pestañas así como del vello corporal. 2. Hipodoncia /Anodoncia: Defectos en la dentición temporal y permanente, como dientes cónicos así como anodoncia parcial o total. 3. Hipohidrosis / Anhidrosis: Ausencia parcial o completa de las glándulas sudoríparas ecrinas, con disminución o ausencia de sudor¹⁵.

Las alteraciones en la sudoración durante el primer año de vida producen hipertermias de repetición, generalmente en los primeros meses de vida. Los síntomas relacionados a la intolerancia al calor o la incapacidad de sudar son de gran ayuda para sospechar en DEH-X. Se presentan hasta en un 90% de los pacientes, por lo que la DEH-X se ha incluido en el diagnóstico diferencial de casos de fiebre de origen desconocido. En el 6% de los casos se pueden presentar crisis convulsivas.^{1,3,4}

Sin embargo, en algunos casos la expresión clínica de la enfermedad no se limitan a la triada y se pueden encontrar otras alteraciones como son:

Alteraciones cráneo-faciales tales como facies con una frente prominente, puente nasal deprimido o nariz en silla de montar, labios prominentes, mentón en punta, fosas nasales visibles, implantación baja de las orejas e hipoplasia media facial que da apariencia de cara en plato en la vista de perfil.¹⁶

También se presentan alteraciones en piel y anexos. Los pacientes pueden presentar dermatitis atópica, hiperpigmentación, arrugas de la región periocular y ausencia o alteraciones ungueales¹⁷.

Dentro de las alteraciones otorrinolaringológicas podemos encontrar, rinitis atrófica, sinusitis de repetición, otitis, boca seca, disfagia y voz ronca, faringitis, como resultado de hipoplasia de las glándulas mucosas del tracto aero-digestivo superior.¹⁸

A nivel respiratorio los problemas más frecuentes encontrados son descarga nasal fétida, infecciones respiratorias de repetición, neumonías, sibilancias y asma.¹⁹⁻²⁰

En las mujeres, estos cuadros son menos frecuentes con excepción de sinusitis de repetición. Pueden afectar tanto a hombres y mujeres y tiene como consecuencia una deficiencia en el vaciamiento de las secreciones nasales, lo que lleva a un mayor riesgo de sinusitis.¹⁸

Los ojos también se ven afectados y pueden sufrir daños en la córnea debido a alteraciones en la calidad de las lágrimas y a una disminución en la secreción de las glándulas de Meibomio, por lo que es importante valorar y tratar este problema a edades tempranas para evitar complicaciones en la córnea.²⁰

El crecimiento y desarrollo de estos pacientes se ve afectado y se pueden encontrar alteraciones en peso y talla. Se ha reportado un retraso en el crecimiento del 40% y bajo peso en la adolescencia en un 44% en los hombres. En las mujeres se ha reportado un retraso en el crecimiento del 26% y bajo peso en la adolescencia en un 33%.¹⁹ Esto se atribuye principalmente a congestión nasal, boca seca, trastornos en la deglución, reflujo gastroesofágico, y a la ausencia en la dentición. Además se ha reportado talla baja secundarios a trastornos en la hormona del crecimiento. Por lo que es muy importante que estos pacientes se les lleven un control adecuado del crecimiento y desarrollo hasta la mayoría de edad y se estudien bien las causas para poder ofrecer oportunamente tratamientos adecuados.¹⁷

2.3 Epidemiología de la DEH-X.

La DEH-X es también conocida como síndrome de Christ-Siemens-Touraine, es la forma más frecuente de todas las DEHs y con una incidencia aproximada de 1 caso por cada 100,000 nacimientos.²¹ Sin embargo, las cifras exactas son desconocidas y podrían ser más casos de los registrados según el reciente trabajo publicado por Mary Nguyen-Nielsen *et al* que presenta el primer trabajo basado en la prevalencia de la DEH-X en la población danesa²². Durante los años 1995-2010 estos autores realizaron un estudio nacional dividiendo los casos categorizados como DEH-X en 3 grupos; 1) Diagnóstico confirmado por estudios moleculares 2) Casos con diagnóstico clínico de DEH y 3) Casos posibles de DEH con suficientes hallazgos clínicos basados en un algoritmo diseñados por los autores. Ellos identificaron 90 casos con diagnóstico molecular, 146 casos clínicamente diagnosticados como DEH y 988 casos posibles de un total de 1224 casos.

La prevalencia que ellos señalan fue de 21.9 por 100,000 habitantes, superando a los informes reportados previamente. Llama la atención la edad de diagnóstico en las formas ligadas al X. Ellos mencionan a la adolescencia (11 y 18 años de edad) como la edad más frecuente del diagnóstico. Las alteraciones dentales llevan la frecuencia más alta (79%) de todos los casos y el 52% de los casos son confirmados por estudios genéticos.²²

En México y gracias a la Asociación Nacional de Displasias Ectodérmicas Mariana (AMDEM, <http://www.amdem.org.mx>) se cuenta con un registro nacional de 79 familias afectadas por DE, 103 varones y 18 mujeres afectadas.

De acuerdo a nuestros registros en la Asociación, 65 (82.2%) familias del total de las 79 familias tienen solo varones enfermos, lo que sugiere una posible herencia ligada al cromosoma X (DEH-X). De estas 65 familias, 55 (84.6%) tienen un solo varón, 9 dos varones y sólo una familia con tres varones enfermos. Nueve familias muestran un patrón posible autosómico recesivo por afección de ambos sexos o exclusivamente mujeres. Cuatro familias muestran la herencia dominante en donde uno de los padres padece la enfermedad y se la heredó a uno de sus hijos.²³

2.4 Diagnóstico.

Otros signos y síntomas observados en los pacientes con DEH-X son: piel, ojos y membranas mucosas así como vías aéreas secas, estas últimas sitios frecuentes de infección, debido a un desarrollo deficiente de las glándulas exocrinas. La forma DEH-X afecta a varones y se puede asociar a signos dismórficos como elevaciones en la frente, oscurecimiento periocular, puente nasal deprimido, labios prominentes y ocasionalmente ausencia o atrofia de pezones.²⁴⁻²⁵

Uno de los primeros síntomas que se presentan los pacientes es la historia de hospitalizaciones por fiebre de etiología desconocida durante la infancia. Así mismo, las mujeres portadoras presentaron cabello delgado y alopecia difusa, así como algunos parches de vello en algunas áreas del cuerpo indicativo de mosaicismos. Algunas otras mostraron dentadura anormal y moderada hipohidrosis. Esto llevó a la conclusión de los autores brasileños (Pinheiro M. y Freire-Maia N.) de pensar en dos formas de la genodermatosis: una mayor en varones y una menor en mujeres. Ellos estimaron que las madres portadoras de varones afectados muestran una

penetrancia del 66%, las hijas de madres portadoras un 81% y finalmente las hijas de varones afectados un 49%.²⁶

Algunos pacientes pueden presentar convulsiones (6%) por las fiebres altas provocadas por la incapacidad de controlar la temperatura ante la ausencia de la sudoración.²⁸

Se ha descrito un retraso mental entre el 10 y 30% de los casos, pudiendo corresponder a los periodos de fiebre prolongada o bien a las convulsiones febriles.²⁸

Las mujeres portadoras de un gen *EDA1* anómalo pueden ser asintomáticas o mostrar manifestaciones clínicas leves o moderadas. Se ha observado que hasta el 70% de ellas muestra algún rasgo sugestivo de la enfermedad. Las manifestaciones más frecuentes son las anomalías dentales, una ligera hipohidrosis y diferentes grados de hipotricosis. Es posible encontrar una distribución en parches del vello corporal, con áreas alopécicas, xeróticas y algo deprimidas de distribución blaschkoide que alternan con áreas normales de piel. Estas áreas afectadas se hacen más evidentes con el bronceado y durante la infancia. En algunas portadoras se ha observado la desviación radial de la falange distal del dedo índice.¹

Capítulo III

3.1 IMPORTANCIA.

a) Detección en el recién nacido.

La fiebre que afecta a los recién nacidos debido a la ausencia de sudoración ante los factores agravantes, como por ejemplo una incubadora, provocará un aumento importante de la temperatura corporal con los posibles efectos de convulsiones y

ocasionalmente muerte (6%). De ahí la importancia de realizar en las familias con casos sospechosos un diagnóstico temprano de la portadora y el afectado. Al realizar un diagnóstico en etapas iniciales en los recién nacidos, se evitará un aumento de la morbimortalidad.

b) *Diferenciación de patrones de herencia.*

En varones es imposible realizar un diagnóstico diferencial entre las formas ligadas al Cromosoma X y las formas Autosómicas Recesivas y Dominantes solo por el fenotipo, motivo por lo cual es necesario realizar el diagnóstico clínico detallado y corroborarlo con estudios genéticos (Figura 4).



Figura. 5. Similitudes clínicas de la DEH en los tres patrones diferentes de herencia. A) Ligado al X, B) Autosómico Dominante y C) Autosómico recesivo. Labios gruesos, nariz en silla de montar, poca ceja y oscurecimiento periocular son algunas características de los pacientes con Displasia Ectodérmica Hipohidrótica.

b) *Detección de portadoras en familiares de los varones enfermos.*

Debido a que las portadoras presentan un fenotipo inespecífico que puede inclusive pasar desapercibido, incluyendo cabello delgado o alopecia difusa en ceja, ausencia de un diente y presencia de un diente cónico o extra, es muy importante detectar a las posibles hermanas del varón afectado y advertirles de la posibilidad de tener un hijo enfermo.

d) Consejo genético.

Al conocerse la condición de portadora será importante tener en cuenta el riesgo de un nuevo varón afectado, así como la identificación de una hija portadora. Así mismo, los varones enfermos podrán transmitir el cromosoma X enfermo a sus hijas. El patrón es recesivo ligado al X, motivo por el cual el 50% de los varones estará enfermo y el 50% será sano, lo mismo ocurre con las hijas de la portadora, de las cuales, el 50% será portadora y el 50% no portará la mutación.

e) Diagnóstico Prenatal en portadoras.

Al identificar mujeres portadoras de mutaciones en el gen *EDA1*, existe la posibilidad de realizar una biopsia de las vellosidades coriónicas durante el embarazo para diferenciar a los embriones enfermos de los sanos durante las primeras semanas de embarazo.

3.2 ORIGINALIDAD DEL ESTUDIO DE LA DEH-X

A pesar de que las mutaciones de la DEH son bien conocidas, ya en el año 2009 se habían reportado más de 100 diferentes mutaciones en la página “The Human Gene Mutation database”: www.hgmd.cf.ac.uk que para el mes de Junio del año 2014, en la misma base de datos ya sumaban 148.

Este trabajo representa una ayuda a las portadoras de mutaciones génicas y representa un protocolo nacional en coordinación con la Asociación Nacional de las Displasias Ectodérmicas.

La idea surgió ante la posibilidad de colaborar con la Asociación Mexicana de Displasias Ectodérmicas y conocer las mutaciones que ocasionan los casos de DEH

en México, así como para revelar las posibles asociaciones genotipo/fenotipo y eventualmente, desarrollar una estrategia de diagnóstico de laboratorio que permita mejorar el diagnóstico y luego apoyar el asesoramiento genético a las familias de los afectados.

CAPITULO IV

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las mutaciones del gen *EDA1* en pacientes diagnosticados con displasia ectodérmica hipohidrótica y hacer una correlación genotipo-fenotipo.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1.-Clasificar y diferenciar las formas de la DEH-X de las formas autosómicas recesivas en donde existan sólo varones afectados.

4.2.2 Identificar mutaciones en el gen *EDA1* en pacientes con DEH-X

4.2.3. De acuerdo al tipo de mutación, definir severidad y presentación clínica de la DEH-X.

4.2.4. Fundamentar el asesoramiento genético prenatal y postnatal en cada familia.

4.2.4 Analizar el gen de interés y comparar si las mutaciones que se descubran ya fueron publicadas en otras etnias o países o bien si son inéditas.

V HIPÓTESIS:

5.1 Hipótesis de trabajo:

El tipo y frecuencia de las mutaciones del gen *EDA1*, descritas en otras poblaciones o etnias para pacientes con displasias ectodérmicas ligadas al X, son diferentes a las encontradas en pacientes mexicanos con esta patología.

5.2 Hipótesis nula

No existe diferencia en el tipo y frecuencia de las mutaciones en el gen *EDA1* en pacientes con displasias ectodérmicas ligadas al X descritas de otras poblaciones o etnias y las de los pacientes mexicanos con esta patología.

VI Población de Estudio

6.1 PACIENTES

6.1.1 Características de la población:

Lugar de referencia y método de reclutamiento:

Para el reclutamiento de pacientes y sus familiares, se consideraron a todos los pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y a los recién nacidos a los que se les sospechó el diagnóstico de DH. Así mismo, a aquellos pacientes con el diagnóstico previo de la enfermedad que se encuentran en la base de datos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

Así mismo se contactó a la Asociación Mexicana de Displasias Ectodérmica (AMDEM www.amdem.org.mx) a la que se le solicitó autorización para llamar telefónicamente a los pacientes a fin de entrevistarlos personalmente para invitarlos a participar a nuestro protocolo. Nuestra población de estudios correspondió a 20 familias de pacientes con DEH-X.

Debido a la rareza de la enfermedad conocida como enfermedad huérfana y su frecuencia desconocida en el país, decidimos contactar a la Asociación Mexicana de las Displasias Ectodérmicas (AMDEM), quienes cuentan con una base de datos de 89 personas afectadas, las cuales forman parte de un total de 69 familias.

6.1.2 Criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico clínico de Displasia Ectodérmica.

Pacientes mestizos mexicanos con ancestría de por lo menos tres generaciones.

Pacientes que firmen la Carta de Consentimiento Informado.

Pacientes de sexo femenino/ masculino.

Pacientes de cualquier edad.

Pacientes con o sin embarazo.

Padre y/o madre del paciente con diagnóstico clínico de Displasia Ectodérmica

6.1.3 Criterios de exclusión:

Pacientes no descendientes de mexicanos, aunque dichos pacientes hayan nacido en México.

Pacientes que disientan de firmar la Carta de Consentimiento informado.

Pacientes con diagnóstico clínico de las siguientes enfermedades:

Disqueratosis congénita, aplasia de cutis congénita, síndrome de Werner, síndrome de Rothmund-Thompson

6.1.4 Criterios de eliminación:

Deseo del paciente de abandonar el estudio, aun cuando haya firmado previamente el Consentimiento Informado.

6.2 Diseño metodológico del estudio:

Este es un estudio observacional, de encuesta Transversal, descriptivo, no ciego y prospectivo de prueba molecular diagnóstica genética.

CAPITULO VII Metodología

7.1 Descripción del diseño:

En la figura 6 se ilustra la estrategia general del trabajo realizado desde la firma del consentimiento informado, historia clínica, obtención de muestras, procesamiento de muestras y secuenciación de productos de PCR.

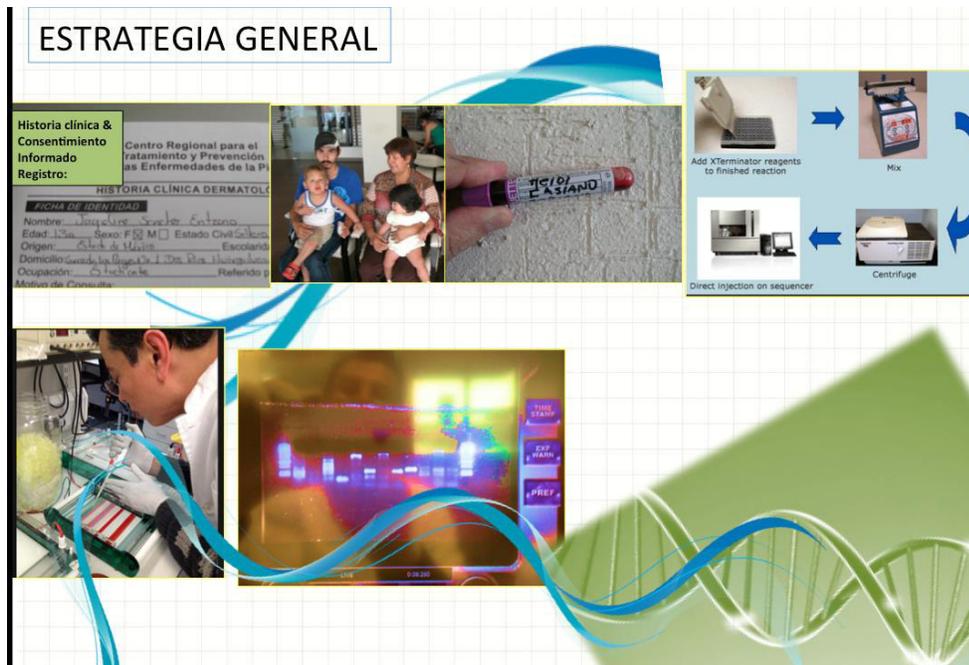


Figura 6. Estrategia general de trabajo. Incluyó la historia clínica detallada, firma de consentimiento informado, toma de fotografías, obtención de sangre, extracción del ADN de los polimorfonucleares de sangre periférica, realización de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el gen de interés (*EDA1*). Posteriormente se realizaron los geles de Agarosa de poliacrilamida para la verificación del producto amplificado y finalmente se realizó la secuenciación nucleotídica de los mismos.

7.1.1.- Se realizó una historia clínica detallada de cada paciente, así como su árbol genealógico, primordial para este protocolo.

La historia clínica incluyó información de origen de abuelos y padres, cuadro clínico especificando la presencia de fiebre, convulsiones, muerte por fiebre e infecciones recurrentes nasofaríngeas. EL 70% de los pacientes presenta descamación ligera de la piel al nacer, cabello escaso, fino, hipoplasia alveolar, dientes cónicos, hiperpigmentación peri ocular, ausencia o hipoplasia de glándula mamaria y eversión labial también fueron analizados a detalle.

7.1.2 A cada paciente o su representante legal se le explicó detalladamente la **Carta de Consentimiento Informado** para su ingreso al protocolo, leyéndosela en voz alta, haciendo énfasis en las posibles complicaciones de la toma de muestra sanguínea.

Se hizo énfasis en que el ADN podría ser utilizado en otros proyectos o trabajos de investigación futuros.

7.1.3 Se realizó una sesión de toma de fotografías de cada uno de los pacientes y portadoras. Cara pose de frente y lateral, piel cabelluda frontal y lateral, tórax anterior fueron imágenes obligatorias de los pacientes.

7.1.4 Posterior a la explicación de los objetivos de nuestro protocolo se tomaron 3.5 mililitros de sangre periférica y la sangre se colocó en un tubo con anticoagulante sanguíneo (EDTA).

Procesamiento de muestras para obtención de ADN de sangre periférica

(Método TSNT):

El método que se utilizó se describe a continuación:

Se colocaron 500 μ l de la sangre en un microtubo de 2.0 ml, se agregó 200 μ l de buffer de lisis TSNT y se mezcló por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos. Agregamos 500 μ l de fenol saturado y se mezcló por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 1 a 3 minutos. Se agregan 100 μ l de Sevag y se mezclan en vórtex a velocidad baja o media durante 3 a 5 minutos. Agregamos 150 μ l de TE 1X y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad media o baja durante 1 minuto y se centrifuga por 8 minutos a 10,000 rpm. Agregar 150 μ l de TE 1X y mezclar por inversión o en vórtex durante 1 minuto.

7.4.3. En el caso de menores en donde fue imposible obtener muestras sanguíneas, se obtuvo una muestra de saliva (30 mililitros y ésta será almacenada en los tubos

recolectores del estuche comercial llamado ORAGENE-DNA kit (DNA Genotek Inc. Ottawa, Ontario, Canadá).

Técnica para extraer ADN de Saliva

Equipamiento y reactivos

1. Microtubos de 1,5 mL (p. ej. Axygen #MCT-150-C).
2. Incubadora de aire o de agua a 50 °C.
3. Etanol (95% a 100%) a temperatura ambiente.
4. Etanol (70%) a temperatura ambiente.
5. Solución de almacenamiento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o solución similar.

Método:

Mezclamos la muestra en el kit de DNA Genotek invirtiendo y agitando suavemente durante uno segundos. Esto se hace para asegurar que las muestras viscosas se mezclan correctamente.

Incubamos la muestra a 50 °C en una incubadora de agua durante un mínimo de 1 hora, ó en una incubadora de aire durante un mínimo de 2 horas.

Transferiremos 500 µL de la muestra mezclada a un tubo de microcentrifugado de 1,5 mL.

El resto de la muestra se puede guardar a temperatura ambiente o congelar (-15 °C a -20 °C).

Para 500 μL de muestra, añadimos 20 μL (1/25 del volumen) de PT-L2P al tubo de microcentrifuga, y mezclamos durante unos segundos usando un agitador (vortex).

Incubamos en hielo durante 10 minutos.

Centrifugamos a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.000 rpm (15,000 x g).

Transferimos con cuidado el sobrenadante claro con la punta de la pipeta a un tubo de microcentrífuga limpio. Posteriormente añadimos a 500 μL de supernadante 600 μL de etanol al 95-100% a temperatura ambiente.

Dejamos la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación completa del ADN.

Colocamos el tubo en la microcentrifugadora en una orientación conocida. Centrifugamos a temperatura ambiente durante 2 minutos a 13.000 rpm (15.000 x g). Esta pastilla contiene ADN. La pérdida de la pastilla supondrá la pérdida del ADN.

7.1.6 Se almacenarán todas las muestras de ADN en refrigeración a temperatura de 4 a 8 grados centígrados para posteriormente, realizar las detecciones de las mutaciones en el gen EDA-1.

Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es conocida como PCR en inglés (Polimerasa chain reacción).

Posterior a la obtención del DNA de la sangre periférica o de la saliva de los pacientes, estos fueron amplificados bajo las siguientes condiciones, de cada PCR son de 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos,

55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se analizarán por Secuenciadora Automática Directa en el equipo ABI Prism 310, utilizando los reactivos “ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing” (PE Biosystem).

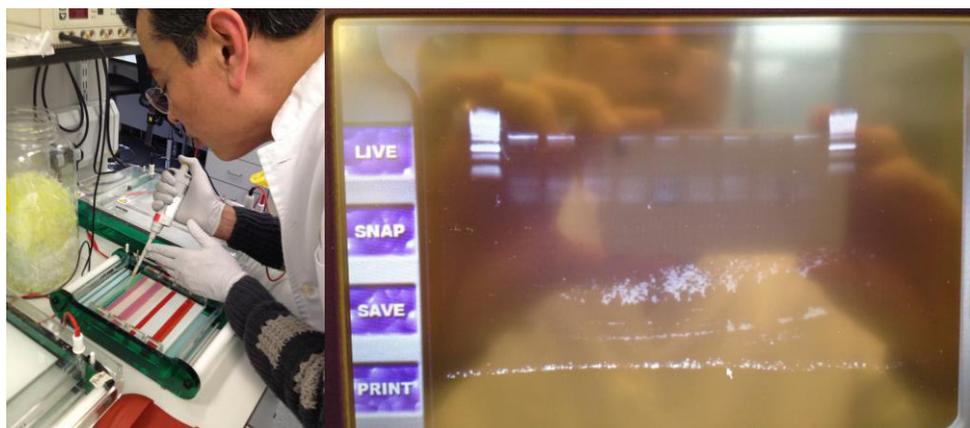


Figura. 7. Colocación en el gel de agarosa los productos de la mezcla de los primers y exones del gen *EDA1* y gel de agarosa que muestra los precipitados de la combinación del PCR de ADN y los primers de los exones del gen *EDA1*.

Análisis de mutaciones.

Los 9 exones del gen *EDA1* fueron amplificados utilizando los primers específicos descritos por Cluzeau y colaboradores.²⁹

La amplificación de los productos de PCR fue realizada utilizando Reactivos AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Tabla 3. Pares de primers utilizados para detectar mutaciones en el gen *EDA1*.

<i>Primer pairs used for mutation detection in EDA1</i>							
Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size	Restriction enzymes	Fragment size	Exon size	Annealing temperature
1	GTCGGCCGGGACCTCCTC	GCCGCCGCCCTACTAGG	686	<i>PstI, TaqI</i>	135, 147, 159, 245	396	66
3	ATGTTGGCTATGACTGAGTGG	CCCTACCAAGAAGGTAGTTC	248			106	57
4	GATCCCTCCTAGTGACTATC	CAGACAGACAATGCTGAAAGA	215			23	57
5	AAAAAAGTAACACTGAATCCTATT	CTCTCAGGATCACCCACTC	287	<i>HinfI</i>	101, 146, 172	180	56
6	GGAAGTCAAAAGATTATGCC	CTACCCAGGAAGAGAGCAAT	113			35	57
7	CTGAGCAAGCAGCCATTACT	GGGGAGAAGCTCCTCTTTG	156			52	57
8	ACTGAGTGACTGCCTTCTCT	GCACCGGATCTGCATTCTGG	214			131	57
9	TGTCAATTCACCACAGGGAG	CACAGCAGCACTTAGAGG	410	<i>PstI</i>	141, 269	252	60

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas utilizando el Sequencing Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y los fragmentos obtenidos del ADN fueron secuenciados utilizando el Analizador 3730xl 96 ADN capilar (Applied Biosystems), Londres, Inglaterra. El control de calidad de la secuenciación y del ensamblaje se realizó mediante los programas phred, phrap y consed.^{30, 3}

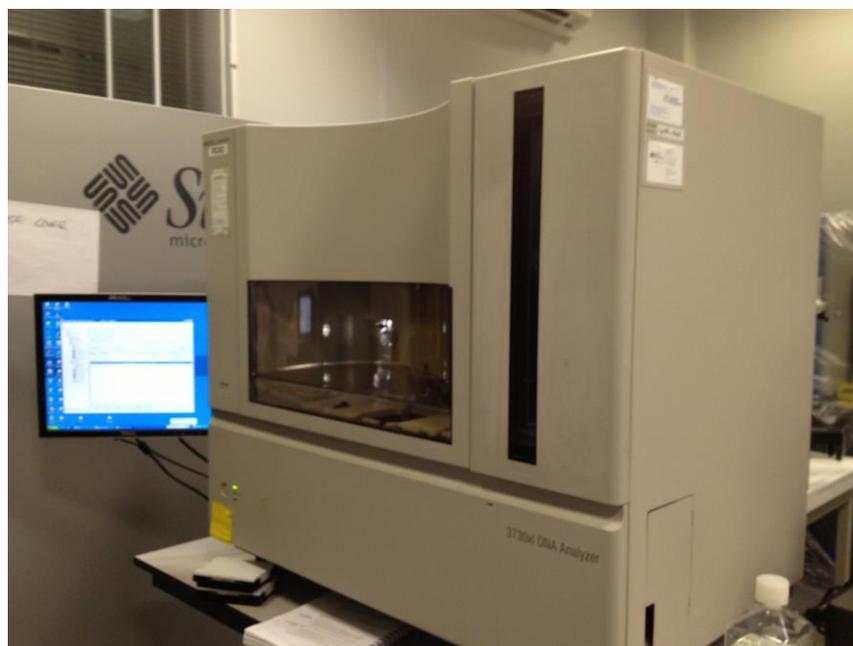


Fig. 8. Secuenciador automática directa 373xl DNA Analyzer, Instituto Blizzar y Centro de Genómica Humana del Hospital Royal de Londres, Inglaterra.

VIII.- RESULTADOS.

Durante los meses de Junio 2012 hasta Noviembre del mismo año se realizaron las entrevistas a 32 familias con el diagnóstico clínico de Displasias Ectodérmicas. Doce familias fueron eliminadas por no cumplir con los criterios de inclusión: 4 familias presentaron patrón autosómico recesivo (varones y mujeres enfermos en la misma familia), cuatro con diagnóstico diferente a DEH, tres con patrón de herencia dominante y una familia con ancestros nacidos en Venezuela.

A todas las familias se les realizó una historia clínica del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Posterior a la firma de la carta del Consentimiento Informado se realizó la historia clínica, tomas de fotografías, y obtención de muestras de sangre y/o saliva.

Debido al patrón de herencia ligado al X en donde sólo los varones desarrollan la enfermedad, las familias “blanco” fueron aquellas con únicamente pacientes varones enfermos sin importar el número de ellos. En este tipo de herencia el 50% de los varones estarán enfermos y el 50% de las mujeres serán portadoras (fig. 7).

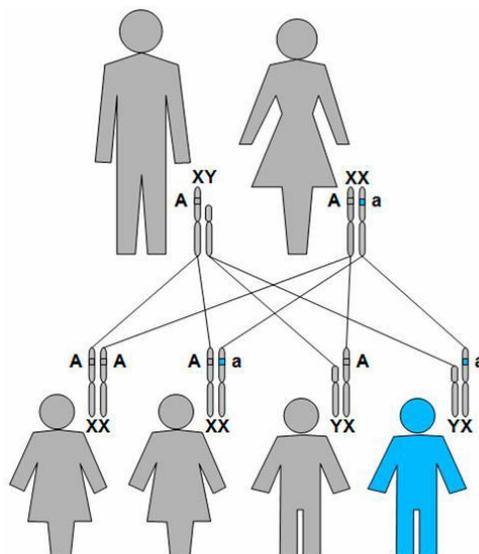


Fig. 9. Patrón de herencia recesiva ligada al X. Un cromosoma X presenta la mutación y éste se trasmite al 50% de los varones (enfermo) y al 50% de las mujeres (portadora) por nacimiento.

8.1 DIAGNOSTICO MOLECULAR EN LAS FAMILIAS.

De las 20 familias que se incluyeron en el protocolo de investigación “Detección de mutaciones en el gen *EDA1* en pacientes con Displasias Ectodérmicas Hipohidróicas ligadas al cromosoma X”, sólo 13 (65%) mostraron mutaciones.

Once mutaciones fueron sin sentido y dos de sentido equivocado.

Las mutaciones se distribuyeron en todos los dominios de la proteína ectodisplasia.

Sin embargo, el 50% se localizaron en el dominio del Factor de Necrosis Tumoral.

A continuación se describe cada familia y al final se muestran tablas con los hallazgos clínicos de los pacientes, portadoras, mutación, tipo de mutación y si la mutación detectada fue inédita o ya conocida.

La forma de selección de familias fue la siguiente: de 32 familias involucradas en el proyecto, 4 mostraban patrón autosómico dominante, cuatro con diagnóstico diferente a displasias ectodérmicas hipohidróicas, tres de patrón recesivo y una familia con ascendencia no Mexicana. Al final únicamente 20 familias se incorporaron al estudio de las cuales el 65% presentaron mutaciones.

A continuación se describen cómo identificar en los árboles genealógicos de las familias estudiadas.

FAMILIA 1.

Originaria de Monterrey Nuevo León, un solo hijo varón de 7 años de edad afectado. No hay antecedentes de más enfermos. Durante el interrogatorio dirigido a la madre refirió que ella y su mamá tienen diente cónico pero niegan más enfermos en la familia (Figura 8).

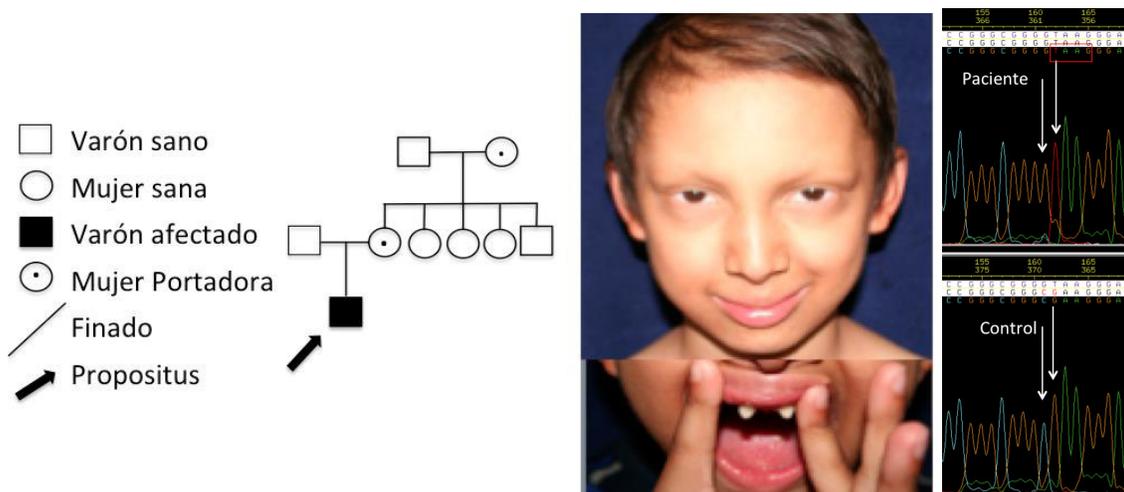


Fig. 10. Árbol genealógico de caso esporádico. Note los dientes cónicos y la ausencia del resto de ellos. Los signos clínicos del paciente son escaso cabello, poca ceja, nariz en silla de montar, labios gruesos, sudar exclusivamente en los pies y ausencia de algunos dientes con la presencia de sólo dos dientes cónicos superiores. La madre tiene un diente cónico incisivo inferior izquierdo.

El resultado de la secuenciación arrojó una mutación sin sentido en el primer exón en donde hubo un cambio de una Citosina por una Timina (TAA) en la posición 106 (c.106C>T) generando una terminación de codón prematura (p.E36Ter) y la producción de una proteína ectodisplasia truncada.

Esta mutación es inédita no habiendo sido descrita a la fecha en otras poblaciones.

FAMILIA 2.

Originaria de Iztapalapa Estado de México, cuenta con una familia formada por 4 hijos, tres de ellos varones en donde el primero murió por fiebre de causa desconocida al nacer. El segundo y tercer hermanos presentan la enfermedad y finalmente tienen una hermana que se desconoce su estado de portadora o sana (Figura 9).

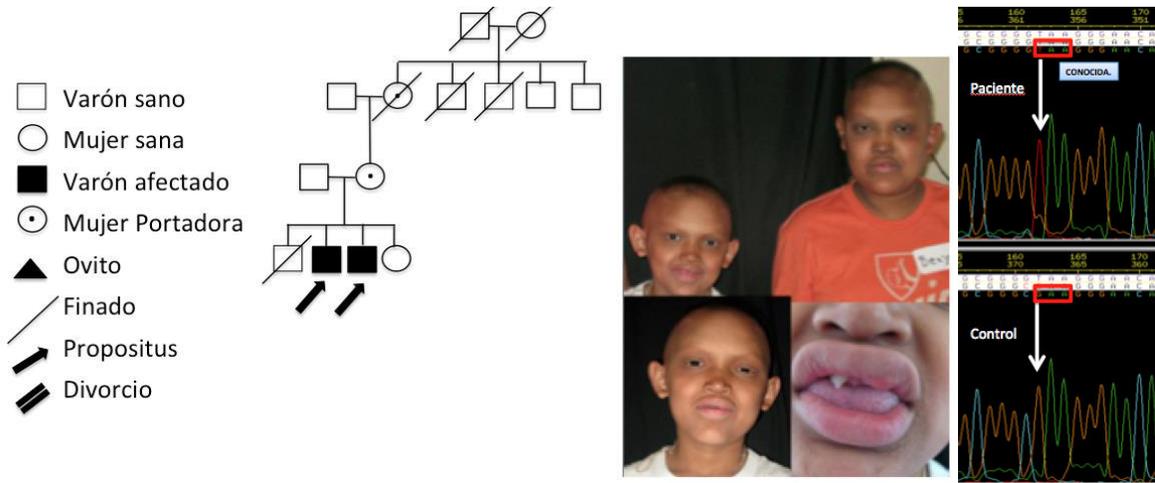


Fig.11. Árbol genealógico en donde dos varones se encuentran afectados y existe el antecedente de hermano mayor finado por causas desconocidas. Se desconoce si la hermana menor es portadora del gen *EDA1* o sana.

El varón mayor tiene 8 años y el menor 6, ambos tienen solo dos dientes muy pequeños cónicos, anhidrosis, cabello escaso, delgado, poca cejas, nariz deprimida en silla de montar, labios gruesos y pigmentación periorcular. Las uñas fueron normales.

El resultado del estudio genético informó un cambio del nucleótido Guanina por una Timina en la posición 382 (c.382C>) (TAA) con un cambio proteico p.E128Ter provocando una mutación sin sentido por codón de terminación prematura con su respectiva proteína truncada en el dominio de la furina en la proteína ectodisplasia. Esta mutación sin sentido ya fue publicada por Pascal Schneider en el año 2001 en los Estados Unidos en una familia con un varón enfermo sin antecedentes de la enfermedad en la familia.³²

FAMILIA 3 .

Familia originaria del Estado de México, con solo dos miembros afectados en la familia nuclear, el mayor tiene 27 años y es el propósito, tiene un hermano sano

aparente. Hay antecedentes de más varones enfermos en primos. Un tío materno finado por causa desconocida durante el primer año de vida.

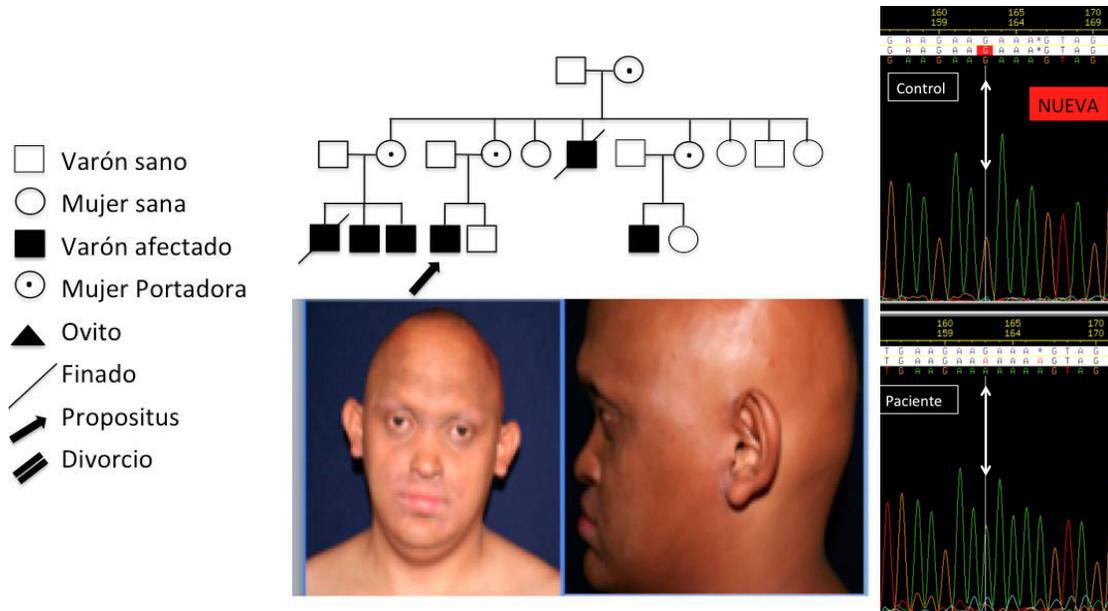


Fig. 12. El árbol genealógico muestra un tío y un primo hermano finados por fiebre durante el primer año de edad. Además existen tres primos hermanos enfermos de la misma patología.

El paciente tuvo fiebre durante el primer año de vida y presenta la tríada característica de las DEH, ausencia total de cabello, anhidrosis y la presencia de dientes cónicos. Carece de cejas y vello corporal, nariz deprimida, labios gruesos y oscurecimiento ocular son otros signos en este paciente. Se obtuvieron información de solo un primo hermano afectado con la misma enfermedad. No se pudo contactar al paciente. El paciente tiene 27 años y cuenta con un hermano menor sano. La madre portadora presenta un diente cónico incisivo inferior izquierdo.

Los estudios moleculares de esta familia mostraron una mutación de sentido erróneo localizada en el exón 3, en donde hubo un cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 448 (c.448G>A) provocando un cambio proteico de ácido glutámico (GAA) por lisina (AAG) (pE150K). Esta mutación es inédita.

FAMILIA 4.

Familia originaria de la ciudad de México, la madre portadora tuvo tres parejas sexuales. Durante el primer matrimonio tuvo un hijo sano y un hijo enfermo de 20 años (propósito 1), con la segunda pareja tuvo un hijo sano y finalmente con el tercer compañero tuvieron un hijo enfermo, actualmente de 12 años (propósito 2).

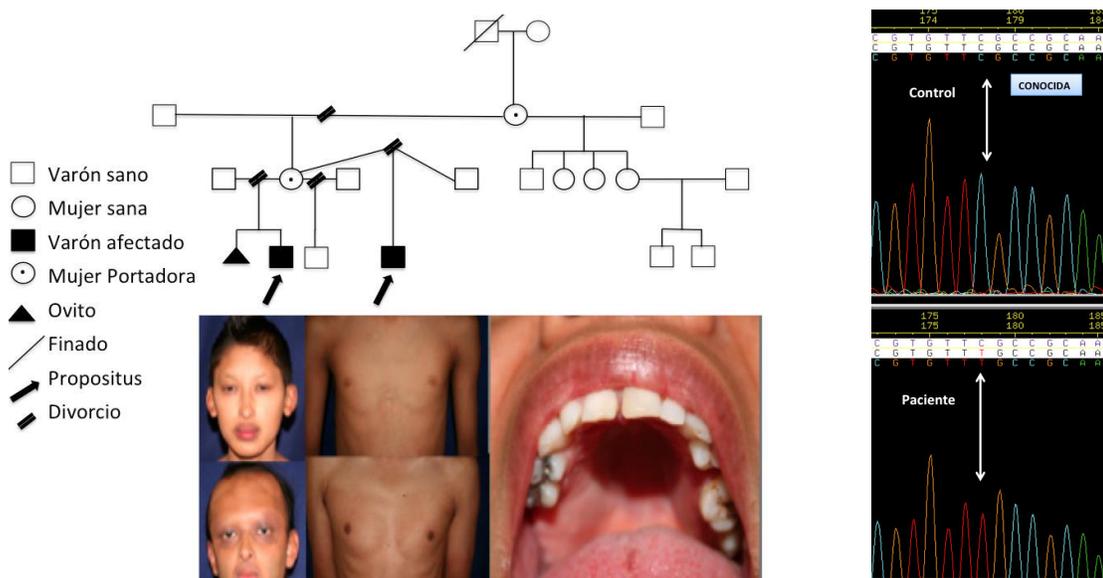


Fig. 13. El árbol genealógico muestra a mujer portadora con tres diferentes parejas sexuales, con el primer y tercer matrimonio tiene hijos enfermos. La exploración de la madre mostró ausencia de una pieza dental.

Ambos muestran signos de la DEH-X cabello escaso (siendo más abundante en el propósito 2) y esté último con antecedentes de fiebre y aparentemente meningitis. Ambos tuvieron fiebre al nacer, muestran ausencia de cejas, labios gruesos, pezones atroficos, y ausencia total para sudar. La madre refirió ausencia de una pieza dental (primera molar izquierda) desde el nacimiento.

Los resultados moleculares confirmaron una mutación de sentido erróneo localizada en el exón 3 en la posición 463 de un cambio de Citosina por Timina (c.463 C>T)

provocando un cambio del aminoácido arginina (CGC) por una cisteína (TGC) (p.R155C) en el dominio de la furina alterando la función de la proteína ectodisplasina. Esta mutación fue publicada por Biancalana et al, Monreal Vincet en poblaciones de Europa como Francia, Holanda, e inclusive en familias chinas.³³⁻³⁵

FAMILIA 5.

Familia originaria del Estado de México con un solo miembro varón afectado en la familia, no existen antecedentes de ningún enfermo en la familia pero la madre refiere dos dientes cónicos inferiores (incisivos). El paciente presento fiebre y convulsiones de recién nacido motivo por el cual se realizó su diagnóstico. El paciente no suda y tiene la tríada de anhidrosis, escaso y delgado vello, poca ceja, 4 dientes cónicos superiores, los demás están ausentes.



Fig. 14. Caso esporádico de un solo hijo afectado. El paciente muestra alopecia, pérdida de cejas y la madre presenta un diente cónico.

Los resultados moleculares de este paciente esporádico mostró una mutación en el gen exón 5 del gen *EDA1* de tipo sentido erróneo en la posición 574 donde hubo un

cambio de una Guanina por una Citocina (c.574G>C), provocando un cambio de aminoácido glicina (GGC) por una Arginina (CGC) (p.G192R). Esta mutación es inédita y afecta el dominio de colágeno alterando la función de la proteína ectodisplasina.

FAMILIA 6.

Paciente masculino de 29 años de edad originario del Estado de México, el tiene 6 dientes cónicos, pelo escaso y delgado, escasa ceja, hiperpigmentación periorcular, anhidrosis, frente amplia y puente nasal deprimido asociado a labios gruesos. No hay más enfermos en la familia y el es hijo único, la madre portadora niega algún problema dental. Cabe mencionar que hay antecedentes de tres ovitos en la familia.

El paciente está de acuerdo con realizarse el estudio genético sin embargo no aceptó la toma de imágenes fotográficas.

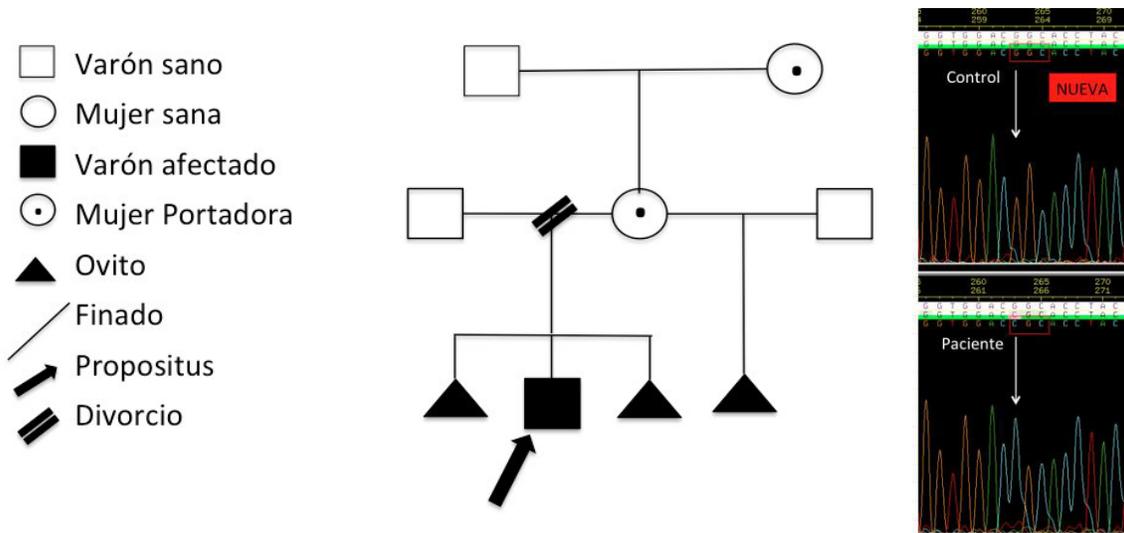


Fig.15. Portadora con dos parejas sexuales, un hijo enfermo y tres ovitos fallecidos de causa desconocida.

Los estudios moleculares mostraron una mutación de sentido erróneo en el exón 8, en donde un cambio de Guanina por Citosina en la posición 894 (c.894G>C, provocó un cambio de los aminoácidos glicina (GGC) por una arginina (CGC) p.G299R. Esta mutación es inédita y no ha sido publicada y afecta la función de la ectodisplasina en el dominio del Factor de necrosis tumoral, alterando la unión con el receptor de la EDA.

FAMILIA 7.

Paciente varón de 4 años de edad con antecedentes de tíos enfermos con misma patología, motivo por el cual su diagnóstico fue al nacer. Son originarios de Toluca, Estado de México. Tiene antecedentes de fiebre y piel seca al nacer, en la exploración clínica presenta cabello delgado y relativamente escaso de color rubio. Labios gruesos y nariz en silla de montar, la madre comenta que no suda absolutamente nada y tiene tres dientes cónicos. El tiene una hermana sana aparente y la madre niega dientes anormales. En su árbol genealógico podemos observar 3 tíos enfermos, uno de ellos falleció por fiebre de origen desconocido al nacer.

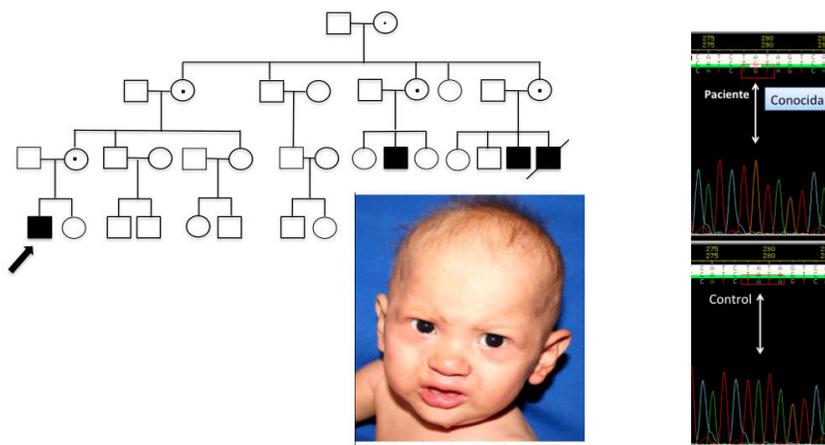


Fig. 16. Familia numerosa con tres enfermos y un paciente fallecido por fiebre durante los primeros meses de vida. Llama la atención el fenotipo “normal” del paciente.

Los resultados moleculares mostraron una mutación de sentido erróneo en el exón 8 sobre la posición 911 en donde hubo un cambio de nucleótido Adenina por Guanina, (c.911A>G), provocando un cambio de aminoácidos, tirosina (TGT) por cisteína (TAT) p. Y304C.

Esta mutación afecta el dominio del factor de necrosis tumoral alterando la proteína ectodisplasina. Esta mutación ya fue publicada en la India por Ramadevi et al.³⁶

FAMILIA 8.

Familia originaria del Estado de México, en donde dos varones están afectados, de 6 y 12 años de edad, este último con Síndrome de Down. No hay antecedentes de más varones enfermos en los familiares. Ambos muestran cabello delgado, escaso y rubio, ausencia de ceja, nariz en silla de montar, labios evertidos, hiperpigmentación periocular.

El varón de 6 años de edad, tuvo fiebre y reportan problemas de aprendizaje, tiene 3 molares y dos dientes cónicos, pezones atróficos y además padece dermatitis atópica.

El varón de 12 años de edad padece además Síndrome de Down, tiene solo dos dientes molares pero ninguno cónico.

Niegan sudoración y ambos tuvieron fiebres de recién nacidos y atopia. La madre y abuela tienen diente cónico.

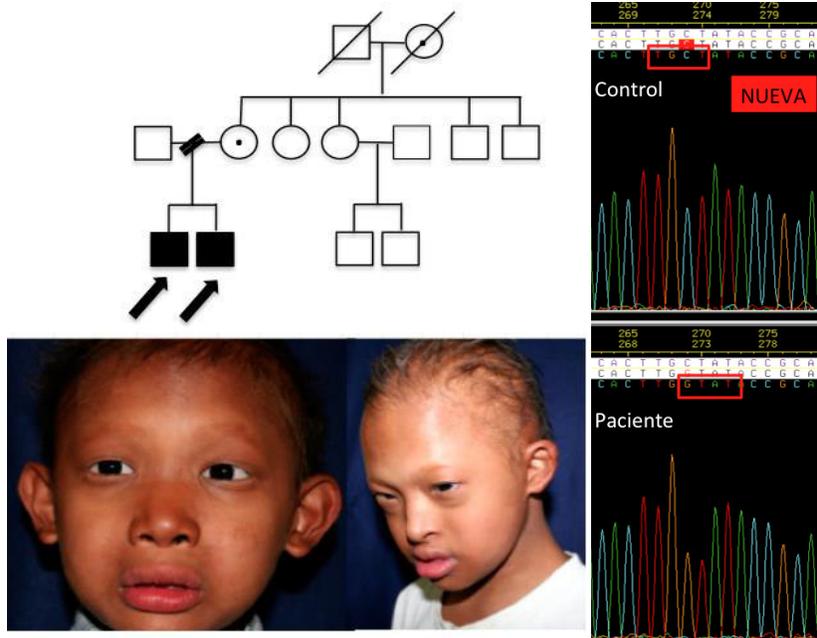


Fig. 17. Familia con dos varones enfermos, uno de ellos con síndrome de Down.

Los resultados moleculares de ambos pacientes mostraron una mutación inédita de sentido errónea localizada en el exón 9 debido a un cambio del nucleótido Citosina por una Guanina en la posición 1038 del último exón (c.1038C>G. P.C346W). Este cambio nucleotídico ocasiono el cambio de lectura con el cambio de un aminoácido cisteína (TGC) por un triptófano (TAT) localizado en el dominio del factor de necrosis tumoral.

Esta mutación es inédita y afecta el dominio del factor de necrosis tumoral, este caso es el primero reportado de la asociación de DEH-X y Síndrome de Down.

FAMILIA 9.

Familia originaria de Xochitepec Morelos, el paciente tiene una hermana sana aparente y dos tíos maternos con la misma enfermedad. La mama se sabía sana sin embargo la abuela se conoce portadora por tener un hijo varones enfermo y un

sobrino también afectado. El paciente tiene 4 años de edad y fue diagnosticado al nacer por el antecedente de la enfermedad en la familia. Nació con una ligera descamación de la piel y padece de Dermatitis Atópica, la madre refiere infecciones frecuentes del sistema faríngeo e inclusive estuvo internado por bronquitis a los dos años de edad. Presenta ligera sordera y problemas para hablar. Muestra la triada característica de pelo delgado, no suda y tiene dos dientes cónicos. Tiene tío y tío abuelo enfermos con DEH.

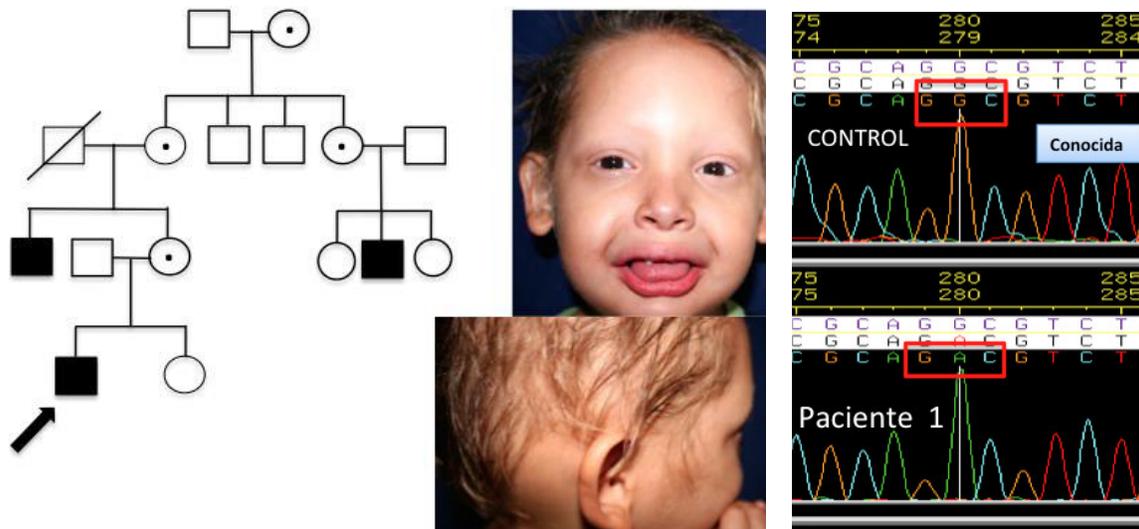


Fig. 18. Árbol genealógico con tres varones enfermos, dos de ellos tíos del paciente analizado. El paciente nariz en silla de montar, labios gruesos y pérdida de cejas y pestañas.

Los estudios moleculares del paciente mostraron una mutación de sentido erróneo ya conocida localizada en el exón 9, posición 1049, caracterizada por un cambio de una Guanina por una Adenina (c.1049 G>A, provocando un cambio de aminoácidos de una glicina (GGC) por un ácido aspártico (GAC) (p.G350D), esta mutación se localiza en el dominio del factor de necrosis tumoral, alterando la función del factor de necrosis tumoral de la EDA.

FAMILIA 10.

Propositus y familia originaria de Xochitepec, Estado de Morelos, con antecedentes de cuatro primos hermanos con la misma condición, dos de ellos murieron por fiebre al nacer. El paciente tiene 15 años y tiene dos hermanas, una mayor y una menor. No existe consanguinidad, y a él lo diagnosticaron al nacer por los antecedentes familiares.

Presenta además de la triada clásica de escaso y delgado cabello, ausencia total de sudoración, y ausencia total de dientes. Además refiere piel seca, dermatitis atópica y fiebres durante el primer año de su vida. Los pezones son extremadamente atróficos. La mamá tiene un diente cónico.

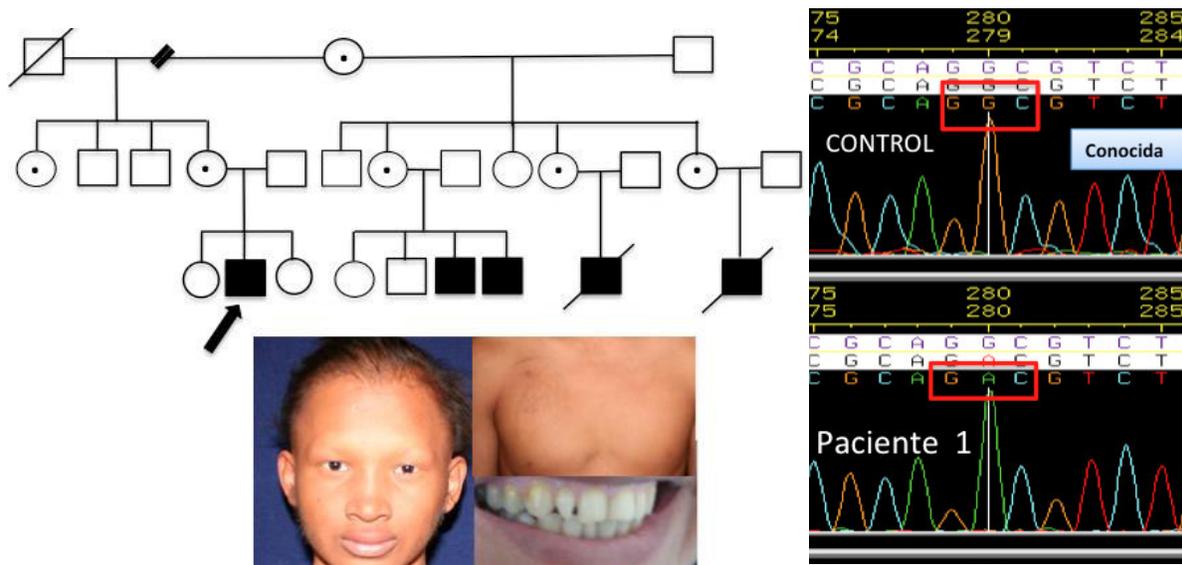


Fig. 19. Familia con cinco varones enfermos de DEH-X, note el antecedente de dos pacientes primos hermanos finados por fiebre. El paciente muestra cabello escaso, labios gruesos, nariz en silla de montar y pezones atróficos. La mamá muestra el típico diente cónico.

Los estudios moleculares mostraron una mutación en el exón número 9 del gen *EDA1*.

La mutación es de tipo sentido erróneo posición 1049, caracterizada por un cambio de

una Guanina por una Adenina (c.1049 G>A, provocando un cambio de aminoácidos de una glicina (GGC) por un ácido aspártico (GAC) (p.G350D), esta mutación se localiza en el dominio del factor de necrosis tumoral, alterando la unión con su receptor EADR.

FAMILIA 11.

Familia originaria de Xochitepec Morelos, radican en Chicago US ambos padres mexicanos. El paciente de mayor edad fue diagnosticado al nacer en los Estados Unidos por los periodos repetidos de fiebre. Tiene el cabello delgado, escaso y carece de pestañas, pero si tiene cejas, refiere anhidrosis y tiene 3 dientes cónicos. Tuvo asma de pequeño y sus uñas son normales.

El paciente de mayor edad también fue diagnosticado al nacer en Chicago Estados Unidos Americanos. Niega fiebre pero padece dermatitis atopia, su cabello es delgado y escaso y carece de pestañas y cejas. Tiene nariz en silla de montar, 10 dientes de éstos cuatro son cónicos. Niega sudoración y sus uñas son normales. La mamá tiene un diente cónico. No hay más familiares afectados.

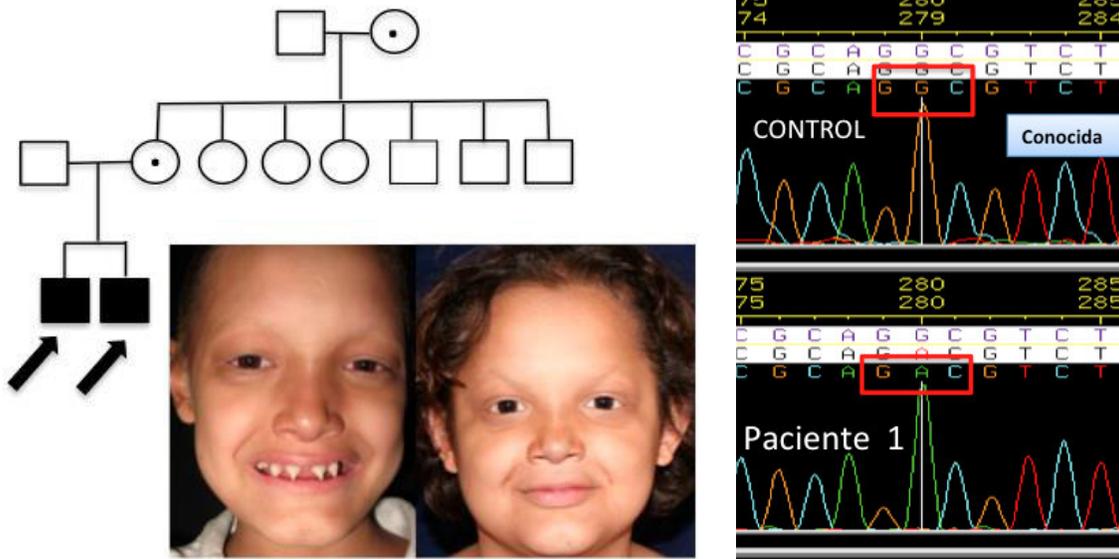


Fig. 20. Árbol genealógico de dos hermanos con DEH-X. Uno de ellos con cuatro dientes cónicos, ambos con escasa ceja, nariz en silla de montar y labios gruesos..

Los estudios de mutaciones en el gen *EDA1*. La mutación es de tipo sentido erróneo posición 1049, caracterizada por un cambio de una Guanina por una Adenina (c.1049 G>A, provocando un cambio de aminoácidos de una glicina (GGC) por un ácido aspártico (GAC) (p.G350D), esta mutación inédita se localiza en el dominio del factor de necrosis tumoral.

FAMILIA 12.

Familia originaria del Estado de Morelos, el propositus tiene 8 años de edad y existen 8 miembros más de su familia afectados, 6 tíos, cuatro de los que murieron al nacer, algunos por fiebre, uno de ellos por crisis convulsivas y uno sin especificar. Existe además un tío abuelo afectado, también finado por infarto al miocardio.

El paciente tiene 8 años de edad y presenta pelo delgado, escaso, ausencia de cejas, pestañas, dientes cónicos, nariz en silla de montar, obscurecimiento alrededor de los

ojos, ausencia total de la sudoración. Presento fiebre al nacer y descamación fina de su piel. La madre es completamente normal.

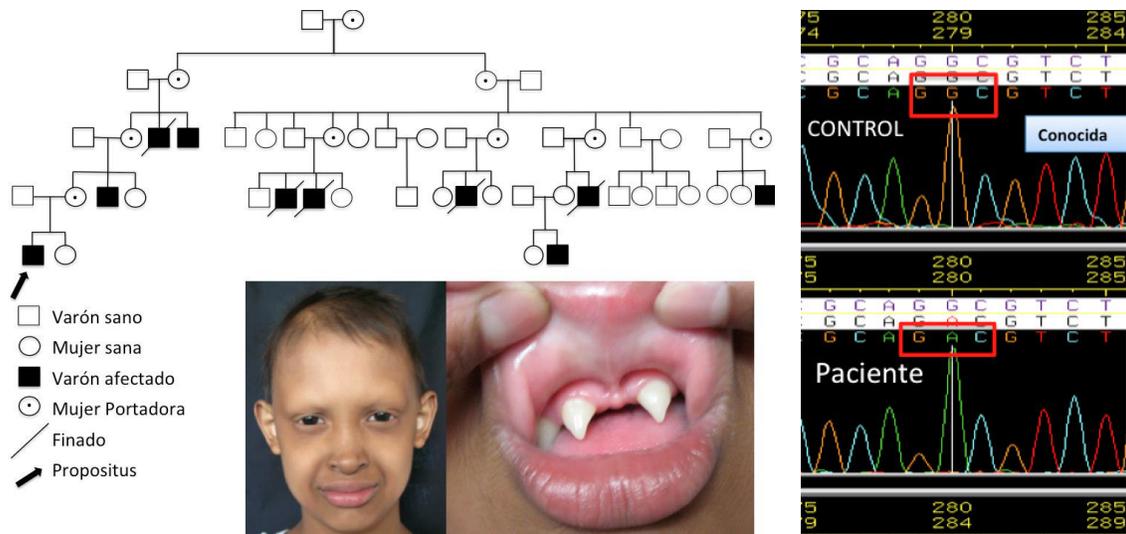


Fig. 21. Árbol genealógico de extensa familia con diez varones afectados con DEH-X. Note la presencia de cuatro varones finados por fiebre. El paciente muestra ceja escasa, poco cabello, labios gruesos, nariz en silla de montar, hiperpigmentación y dientes cónicos.

Los estudios de mutaciones en el gen *EDA1*. La mutación es de tipo sentido erróneo posición 1049, caracterizada por un cambio de una Guanina por una Adenina (c.1049 G>A, provocando un cambio de aminoácidos de una glicina (GGC) por un ácido aspártico (GAC) (p.G350D), esta mutación inédita se localiza en el dominio del factor de necrosis tumoral, alterando la unión con su receptor.

FAMILIA 13.

Familia originaria del Distrito Federal, sin antecedentes de la enfermedad, se trata de un varón de 3 años de edad, fue diagnosticado al nacer por fiebres y convulsiones en el Instituto Nacional de Pediatría, al nacer presento descamación fina de la piel. La madre comenta infecciones repetidas de la faringe y problemas de aprendizaje. El paciente tiene un cabello normal, carece de cejas, no suda absolutamente nada y

solo tiene dos dientes cónicos y dos molares. Los pezones son pequeños y no muestra el fenotipo característico de las DEH, incluso podría pasar inadvertido clínicamente. La madre no muestra hallazgos clínicos anormales.

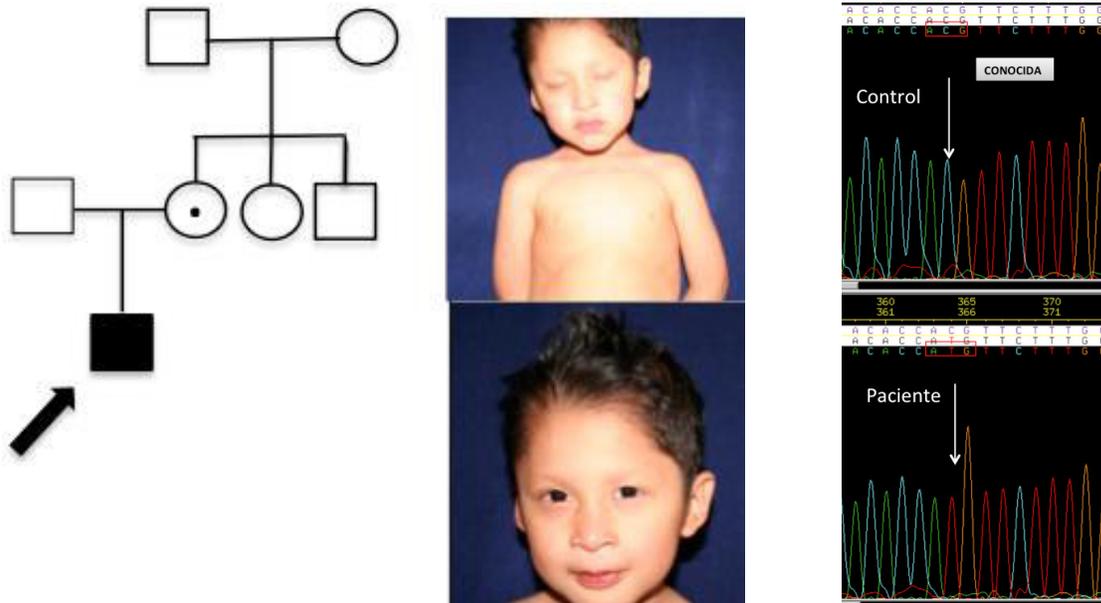


Fig. 22. Árbol genealógico de caso esporádico de DEH-X. El aspecto del paciente podría pasar como normal ya que tiene cabello de aspecto normal. Este fenotipo es un gran reto al clínico por su ausencia clínica de signos característicos de DEH.

Los estudios moleculares de la secuenciación del gen *EDA1* reportó una mutación de sentido erróneo en el dominio del factor de necrosis tumoral del exón 9. En la posición c.1133 hubo un cambio de una Citosina por una Timina, (c.1133C>T), provocando un cambio de aminoácidos, una Treonina (ACG) por una Metionina (ATG) casi al final de la proteína ectodisplasia (p T378M). Esta mutación ya ha sido reportada previamente por Pascal Scheneider.³²

CORRELACION FENOTIPO-GENOTIPO.

Los resultados de la exploración clínica de los pacientes y sus respectivas madres con Displasia Ectodérmica Hipohidrótica ligadas al cromosoma X se muestran en la tabla 1; mientras que los resultados de los pacientes en quienes las mutaciones del gen *EDA1* fueron negativos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas de pacientes y portadoras con DEH-X.

Fam	Código	Cabello	Dientes	Sudor	Pezones	Otros	Exón	Nucleótido	Proteína	Mutación	Hallazgo en Madre
1	12003 12004	Escaso Escaso	6 cónicos 5 cónicos	Ausente Ausente	Normales Pequeños	Fiebre Meningitis	3	c.463C>T	R155C arginina/cisteína	Conocida De sentido erróneo	Diente cónico
2	12006	Escaso	3 cónicos	Solo pies	Normales	Fiebre	1	c.106C>T	E36Ter Terminación prematura	1.- Nueva Sinsentido	Diente cónico
3	12021	Escaso	3 cónicos	Ausente	Pequeños	Fiebre Xerosis	8	c.911A>G	Y304C Tirosina/ cisteína	Conocida De sentido erróneo	NORMAL
4	12024 12025	Escaso Escaso	2 Cónicos 2 Cónicos	Ausente Ausente	Pequeños Normales	Fiebre D. Atopia	1	C.382C>T	Q128Ter Terminación prematura	Conocida Sinsentido	Diente cónico
5	12032	Escaso	6 Cónicos	Ausente	Normales	Xerosis	9	c.1049G>A	G350D Glicina/ aspártico	Conocida De sentido erróneo	Diente cónico
6	12041	Escaso	4 cónicos	Ausente	Normales	Fiebre	3	c.448G>A	E150K Ac. Glutámico/ lisina	2.- Nueva De sentido erróneo	Diente cónico
7	12043	Escaso	6 Cónicos	Ausente	Pequeños	Xerosis	8	c.894G>C	G299R Glicina/arginina	3.- Nueva De sentido erróneo	NORMAL
8	12046	Escaso	Ninguno	Ausente	Ausente	Atopia	9	c.1049G>A	G350D	Conocida De sentido erróneo	Diente Cónico
9	12048 12049	Escaso Escaso	4 Cónicos 3 Cónicos	Ausente Ausente	Normales Normales	D. Atopia Asma	9	c.1049G>A	G350D	Conocida De sentido erróneo	NORMAL
10	12057	Escaso	4 Cónicos	Ausente	Normales	Fiebre convulsiones	5	c.574G>C	G192R Glicina/arginina	4.- Nueva De sentido erróneo	Ausencia de un diente.
11	12059	Escaso	4 Cónicos	Ausente	Normales	Fiebre	9	c.1049G>A	G350D	Conocida	NORMAL
12	12061 12062	Escaso Escaso	2 Cónicos Ninguno	Ausente Ausente	Pequeños Pequeños	Fiebre D. Atopia	9	c.1038C>A	p.C346W Cisteína/ triptófano	5.- Nueva De sentido erróneo	Diente cónico
13	12069	Escaso	2 cónicos	Ausente	Ausentes	D. Atopia/ fiebre Convulsiones	9	c.1133C>T	T378M Treonina/ metionina	Conocida De sentido erróneo	NORMAL

Cabe mencionar que en cuatro familias se analizaron a dos miembros enfermos con DEH y mostraron diferente fenotipo siendo la cantidad de cabello una de ellas y el número de piezas dentarias otro hallazgo digno de mencionar.

Todos los pacientes mostraron cabello escaso pero dos de ellos mostraron cabello más abundante que sus respectivos hermanos enfermos. Respecto a la cantidad de

dientes, observamos 3 pacientes con 6 dientes cónicos y tres pacientes con dos dientes cónicos. Dos pacientes mostraron tres dientes cónicos al igual que 4 pacientes. Cuando se comparó la sudoración notamos que solo uno (1:17) de ellos presento sudoración en los pies. La cantidad de dientes cónicos así como la ausencia de dientes normales fue muy variable algunos presentaron dos dientes cónicos, otros cuatro y algunos ningún diente. Los pezones fueron pequeños en 6 de 17 pacientes.

La fiebre se presentó en 9 de 17 pacientes, todas ellos durante el primer año de vida.

Piel seca fue otro signo clónico observado en 3 de 17 pacientes.

Analizando los árboles genealógicos se confirmaron cuatro casos de muerte por fiebre al nacer. Existió un caso de meningitis y crisis convulsiones. Cinco pacientes mostraron Dermatitis atópica, asma y piel seca (xerosis) fueron otras entidades asociadas.

Las uñas fueron normales en todos los pacientes analizados en este grupo. Las portadoras mostraron cambios exclusivamente en los dientes, 7 de 13 mostraron diente cónico, el resto presento dentadura normal y solo en una se observó la ausencia de una pieza dentaria desde el nacimiento. De acuerdo a los árboles genealógicos de estas 13 familias, se observó un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X con penetrancia variable en donde hubo familias con varones sanos y varones afectados.

Las características clínicas de los pacientes y madres negativos a las mutaciones en el gen EDA1 mostraron el mismo fenotipo de los pacientes con mutaciones en el gen

EDA1, a excepción de las madres quienes no mostraron alteraciones en los dientes. Solo una de ellas refirió cabello delgado, pero al interrogar acerca el resto de las mujeres de su familia, parece que su madre y hermana presentaron el mismo patrón de cabello delgado.

Tabla 5. Hallazgos clínicos de pacientes y madres con resultados negativos al *gen EDA1*.

Familia	Código	Cabello	Dientes	Sudoración	Pezones	Otros síntomas	Hallazgo en Madre
14	12008 12009	Escaso Escaso	2 cónicos 2 cónicos	Ausente Ausente	Pequeños Pequeños	Fiebre	NORMAL
15	12017	Escaso	2 cónicos	Ausente	Normales	Fiebre	NORMAL
16	12039	Escaso	Ausentes	Ausente	Pequeños	Fiebre, D. atópica	NORMAL
17	12051	Escaso	1 cónicos	Ausente	Normales	Fiebre	NORMAL
18	12065	Escaso	4 cónicos	Ausente	Normales	Xerosis	NORMAL
19	12079	Escaso	2 cónicos	En parches	Pequeños	Fiebre	NORMAL
20	12083	Escaso	6 cónicos	Ausente	Pequeños	Fiebre Convulsiones	Cabello delgado

Después de secuenciar todos los exones del *gen EDA1* en las 20 familias de solo varones afectados con signos y síntomas de DEH, únicamente 13 de ellas (65%) mostraron mutaciones en uno de los exones (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del análisis de mutaciones en el gen *EDA1* en las 13 familias con DEH-X.

Exón	Variación	Cambio proteico	Mutación (tipo)	Efecto en la proteína
1	c.106G>T	p.E36Ter	Sin sentido	Proteína truncada.
1	c.382C>T	p.Q128ter	Sin sentido	Proteína truncada.
3	c.448G>A	p.E150K	Sentido erróneo	Unión defectuosa del dominio FURIN
3	c.463C>T	p.R155C	Sentido erróneo	Unión defectuosa del dominio FURIN
5	c.574G>C	p.G192R	Sentido erróneo	Triple hélix truncado.
8	c.894G>C	p.G299R	Sentido erróneo	Plegamiento proteico alterado.
8	c.911A>G	p.Y304C	Sentido erróneo	Plegamiento proteico alterado.
9	c.1038C>G	p.C344W	Sentido erróneo	Terminal rico en Cisteína roto
9	c.1049G>A	p.G350D	Sentido erróneo	Plegamiento proteico alterado.
9	c.1133C>T	p.T378M	Sentido erróneo	Destrucción del dominio FNT.

• Nuevas mutaciones in rojo.

Las mutaciones en rojo son inéditas. Siendo la primera p.E36Ter de tipo de sin sentido el resto son de índole de sentido erróneo.

En cada mutación se provoca un efecto en la proteína displasina alterando la función de la misma con los cambios embrionarios en los diferentes tejidos derivados del ectodermo.

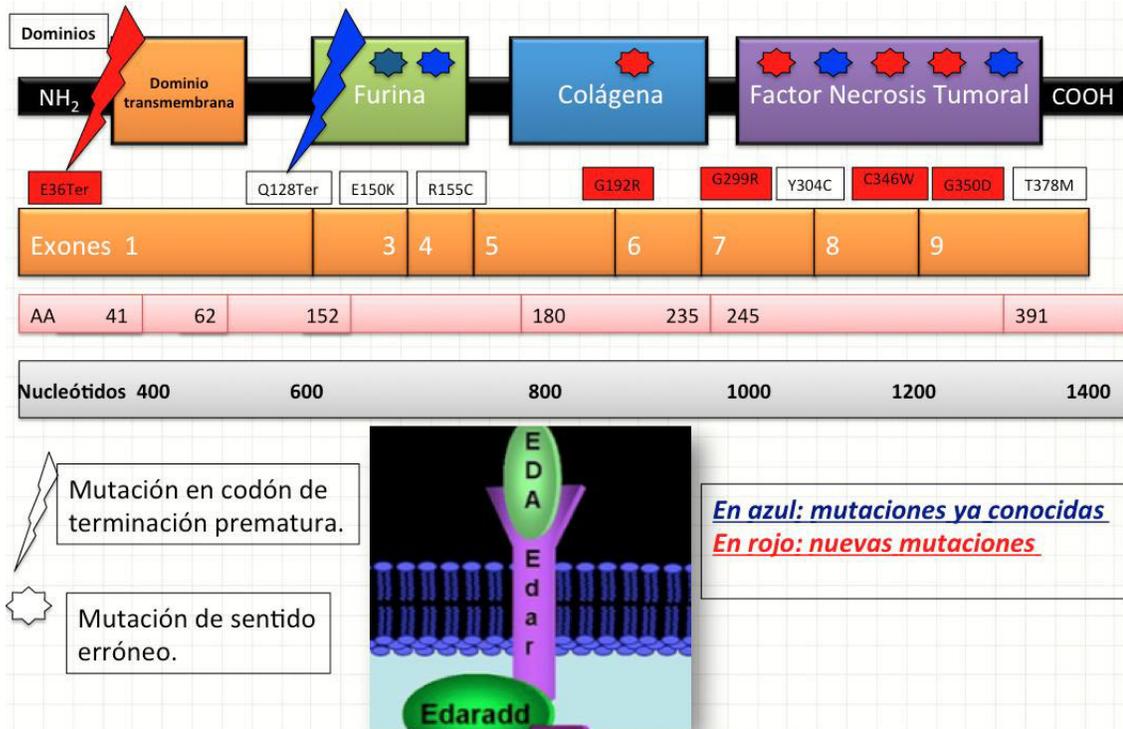


Figura 23. Dominios de la proteína ectodisplasina y sus correspondientes mutaciones. Los exones del gen del 1 al 9, los 391 aminoácidos y finalmente los 1400 nucleótidos que forman la proteína ectodisplasina.

Capítulo IX

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizará de manera clínica los resultados obtenidos, de manera de responder los objetivos establecidos, aunado a lo anterior los datos serán capturados en una base de datos desarrollada en el programa Excel 2010 y analizados en el programa IBM SPSS Statistic 21; se determinarán las medidas de tendencia central, de posición y dispersión en las variables de tipo cuantitativo y las frecuencias en las cualitativas.

Capítulo X

10. DISCUSIÓN

A la fecha, más de 140 mutaciones en el gen EDA han sido descritas, en donde la 121 son de tipo de sentido equivocado o sin sentido, 36 corresponden a pequeñas deleciones, 23 a grandes deleciones y 21 de tipo splicing (Página de internet HGMD). En éste cohorte de 20 pacientes varones con HED detectamos mutaciones en 13 familias (65%) de un total de 20 familias de varias generaciones no relacionadas.

No encontramos mutaciones en 7 familias y serán necesarios los estudios mutacionales en los genes EDAR y EDARDD, WNT10 para descartar otro patrón de herencia.

En esta serie de diez mutaciones reportadas, 5 mutaciones son inéditas y representan un gran avance en el entendimiento de las DEH ligadas al cromosoma X en México ya que las madres portadoras de este gen tendrán la posibilidad de transmitir la enfermedad al 50% de los varones por parto.

En siete familias con afección solo de varones, no fue posible encontrar mutaciones, lo que podría explicarse por medio de las posibles razones, a) que se trate de formas autosómicas, b) que sean otras formas incompletas de DEH, c) que las mutaciones se encuentran en regiones no codificadoras (intrones, inversiones o duplicaciones), d) existan otros genes como causales de la enfermedad aun no descubiertos.¹²

Nuestro porcentaje de detección del 65% de mutaciones es semejante al referido por otros autores.³²

Identificamos las siguientes mutaciones inéditas (marcadas en rojo) en nuestra población mexicana (Figura 24)

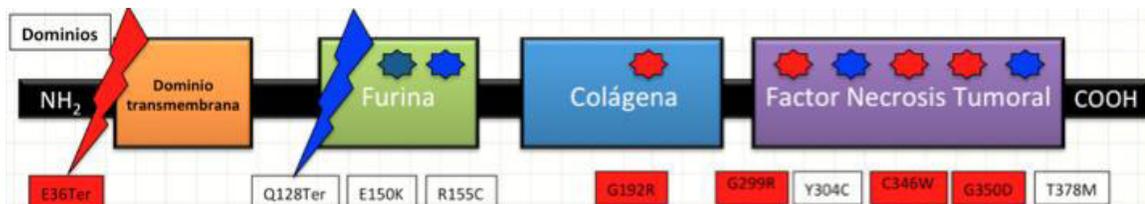


Figura 24. Dominios de la proteína ectodisplina con sus respectivas mutaciones, en rojo se muestran las mutaciones inéditas y en azul las ya publicadas. La figura de “rayo” representan las dos mutaciones de terminación de codón prematuro y las de “estrella” las mutaciones de sentido equivocado.

En el dominio de la furina tres mutaciones fueron encontradas, la primera de terminación prematura o sin sentido (A128Ter), en donde un cambio de nucleótido GAG por un TAG provocó el cese de la producción de la proteína Ectodisplina. Esta mutación fue publicada por Schneider en el año 2001 en una familia de Suiza.

También reportamos dos mutaciones de sentido equivocado (E150K y R155C), en este dominio de la furina y parece que los residuos de arginina juegan un papel importante en la función proteolítica de la EDA, necesaria para el desarrollo del ectodermo en vivo. La primera mutación E150K es inédita y la segunda ya se ha reportado en familias de Suiza y Estados Unidos.^{12, 32}

La mutación inédita E36ter representa una mutación de terminación prematura localizada en el dominio transmembrana impidiendo la formación correcta de la proteína ectodisplina.

Solo una mutación de sentido equivocado inédita reportamos en el dominio de la colágena (G192R), las mutaciones en este dominio se cree que inhiben la mineralización de la región homóloga del FNT.³⁸

De las 10 mutaciones encontradas, cinco son de sentido equivocado y se localizan en el dominio del Factor de Necrosis Tumoral (FNT=TNF), lo que concuerda con publicaciones previas³⁶ (p.G299R, (GGG por AGC) p.Y304C, p.C346Y, p.G350D, p.T378M) todas ellas son inéditas a excepción de la mutación p.Y304C (TAT por TGT) publicada por el grupo de Ramadevi en el año 2008 en un paciente de la India.³⁶

La mutación p.G350D se encontró en 4 familias no relacionadas, todas ellas que habitan en Toluca y el Estado de Morelos, lo que la hace una mutación recurrente e inédita, en ella existe un cambio de Glicina (GGC) por un ácido aspártico (GAC).

Estas mutaciones puntuales afectan los residuos de aminoácidos importantes para la interacción con el receptor-ligando.^{39,40}

La mutación (T378M=Treonina (ACG) por metionina (ATG), afecta la secreción y agregación de la *EDA*, sin embargo, la razón estructural para este comportamiento no es claro.

En resumen las mutaciones en el dominio del FNT resultan de una abolición o impedimento de la unión de la *EDA* al receptor de la misma.

Las mutaciones que no ocurren en este dominio, no afectan la unión con el receptor.

Investigaciones futuras son necesarias para entender los mecanismos moleculares de pérdida de función de la *EDA* como causante de las DEH-X, en particular las de tipo deleciones.³²

De acuerdo a nuestros resultados en México, se sugiere iniciar la búsqueda de mutaciones en los exones 7,8 y 9 que regular el dominio del FNT.

Capítulo XI

11. CONCLUSIONES.

Reclutamos 32 familias con displasias ectodérmicas hipohidróicas, cuatro familias mostraron herencia dominante, tres recesiva, cuatro con diagnósticos diferentes a DEH y finalmente, una familia tenía ancestros de un país diferente a México.

De las 32 familias iniciales, en 27 pudimos esclarecer el patrón de herencia, quedando de la siguiente forma: 20 de patrón sugestivo Ligado al X, 4 Autosómico dominante y 3 Autosómico Recesivo.

Los estudios de detección de mutaciones del gen *EDA1* en las 20 familias con afección de varones exclusivamente, en 13 encontramos mutaciones (65%).

Encontramos diez mutaciones en las trece familias, dos resultaron del tipo sin sentido (de codón de terminación prematuro), ubicándose una de ellas en el exon 1 (c.106G>T, p.E36Ter, previamente descrita por Schenider y cols.³² y la otra resultando inédita y ubicada en el exón 3 (c.448G>A, p.E128Ter), ambas acortando a la proteína desde su dominio transmembranal. Ocho mutaciones corresponden a de tipo de sentido erróneo, siendo la más frecuente y observada en cuatro familias no relacionadas, el cambio nucleotídico c.1049G>A que resulta en el cambio protéico p.G350D. Esta mutación inédita se localiza en el exón 9 y afecta el dominio del FNT de la proteína.

En cuanto a la novedad de las diez mutaciones encontradas, cuatro habían sido previamente descritas en poblaciones de Europa, Asia, India y los Estados Unidos. Mientras que seis resultaron ser inéditas, correspondiendo a una terminación

prematura y cinco a cambios de sentido erróneo (p.E128K, p.G192R, p. G299R, p.C346W y p.G350D); de estas últimas, cuatro se ubican en el dominio del FNT de la proteína.

Los resultados revelaron que en el 65% de los casos confirmados como DEH existen las mutaciones en el gen *EDA1*. Este porcentaje coincido con los porcentajes reportados previamente por otros grupos de investigación.

De las trece familias con mutaciones en el gen *EDA*, 11 tuvieron casos de muertes en recién nacidos por fiebre. Una de las familias tenía el antecedente de la pérdida de hasta cuatro infantes durante el primer año de vida por fiebre, y es en estas familias donde el asesoramiento genético podrá evitar en el futuro muertes por fiebre en los posibles varones recién nacidos afectados.

En siete familias con afección sólo de varones, no fue posible encontrar mutaciones, lo que podría explicarse por medio de las posibles razones, a) se traten de formas autosómicas, b) se traten de otras formas incompletas de DEH, c) las mutaciones ocurren en regiones no codificadoras (intrones, inversiones o duplicaciones) y d) existan otros genes como causales de la enfermedad aun no descubiertos. En estas seis familias actualmente se están analizando los otros genes asociados a la DEH, como lo son el *EDAR*, *EDARADD* y el *WNT10*.

Todos los pacientes mostraban la clásica triada de la enfermedad, alteraciones en la sudoración, dientes y cabello. Algunos de ellos mostraban pezones atróficos, pero interesantemente ninguno mostró cambios ungueales.

Comprobamos que existe variabilidad clínica entre pacientes e inclusive intrafamiliar en donde hay hermanos afectados, uno con cabello de aspecto normal y el otro no.

Los resultados de este estudio en pacientes Mexicanos con DEH-X constituyen una herramienta valiosa para el diagnóstico clínico y ayudan a diferenciar las formas dominantes y las recesivas, de las ligadas al X. Además, permiten diferenciar a las mujeres sanas de las portadoras y, como se describió previamente, detectar a los bebés afectados para evitar complicaciones que frecuentemente resultan fatales.

Capítulo XII

12. ANEXOS

12.1 Carta de Consentimiento



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

CONSENTIMIENTO PARA SER SUJETO EN LA INVESTIGACIÓN

Este documento se presenta de conformidad con el artículo 100 Sección IV de la Ley General de Salud en vigor con la última modificación del mismo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de junio del 2005. El consentimiento informado por escrito debe ser obtenido de la sujeto en quien se llevará a cabo la investigación, o de su representante legal en el caso de incapacidad legal de la sujeto, una vez que hayan sido informados de los objetivos de la investigación y de las posibles consecuencias positivas o negativas que podría tener para su salud.

Esta forma de consentimiento describe el estudio de investigación y su papel como participante. Por favor lea este formulario cuidadosamente. No dude en hacer cualquier pregunta con respecto a la información proporcionada. Esto debería estimular sus preguntas. Su médico, enfermera, o una persona del equipo le describirá el estudio y responderá a sus preguntas.

1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO;
DETECCION DE MUTACIONES EN PACIENTES MEXICANOS CON DISPLASIA ECTODERMICA
LIGADA AL X

Se le pide participar en un estudio de investigación. Antes de dar su consentimiento para ser voluntario, es importante que lea la siguiente información y hacer tantas preguntas

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

como sea necesario para asegurarse de que entienda lo que se le pide que haga.

2.- LOS INVESTIGADORES

Dr. Julio Cesar Salas-Alanis (Investigador principal), Médico Cirujano Partero con especialidad en Dermatología, afiliado al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en la calle de Madero y Gonzalitos sin número de la Colonia Mitras Centro de la Ciudad de Monterrey, Nuevo León CP 64460, teléfono (81)-8348-14-65.

Director de tesis; Phd Hugo Alberto Barrera Saldaña, departamento de Bioquímica y Medicina Moleclar, ubicado en avenida Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño sin número, colonia Mitras Centro cp 64460, MTY. NL., teléfono 81-8328 40 50 ext 2591 habarrera@gmail.com.

Codirectores de Tesis:

1.- Dermatóloga Carla DuranMckinster, Jefe del Servicio de Dermatología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, ubicado enEstamos al sur de la Ciudad de México, Insurgentes Sur 3700, Letra C, Col. Insurgentes Cuicuilco , Delegación Coyoacán , C.P. 04530, 55 33 98 51 31, caroladmc@yahoo.com.mx.

2.- PhD AngelaChristiano, Director de la Unidad de Investigación básica del Departamento de Dermatología de la Universidad de Columbia ubicada en 1150 St. Nicholas Ave., RussBerriePavillion, Room 303B New York NY 10032, 212-851-4850, amc65@columbia.edu.

3.- Dermatólogo Jorge J Ocampo Candiani, Jefe del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en la calle de Madero y Gonzalitos sin número de la Colonia Mitras Centro de la Ciudad de Monterrey, Nuevo León CP 64460, teléfono (81)-8348-14-65.

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pta. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

3.- INTRODUCCIÓN

La displasia ectodérmicaectodérmica ligada al cromosoma X, es una enfermedad poco frecuente caracterizada por ausencia de glándulas écrinas (secretan sudor y se localizan en todo el cuerpo, sin embargo, en la piel de las palmas y plantas son mas abundantes), piel seca, pelo escaso y anomalías dentales (dientes en forma de cono). Entre las características clínicas se encuentran el abombamiento de la frente, mentón afilado, puente nasal prominente, pigmentación alrededor del ojo y, aunque no siempre, dientes cónicos.Noventa y cincopor ciento de los pacientesanalizados al azarpresentan la forma ligada al cromosoma X.Esta enfermedad es causada por mutaciones en algunos genes (unidades de la herencia), e eneste grupo de pacientes el gen es llamado EDA1 (ectodisplasia A). Este gen juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario del cabello, piel, uñas y glándulas salivales y sudoríparas, de ahí los síntomas (molestias) y signos (características de la piel, pelo, uñas y dientes) de los pacientes.Alrededor de 50 mutaciones(alteraciones en los genes) en el gen EDA1hansido identificadas en pacientes con ectodermiadisplasiahipohidrotica o anhidróticaligada al cromosoma X. La mayoría de lasmutaciones se deben a un cambio de un aminoacido (pequeñasporciones de lasproteínas) en la proteínareceptora (EDA) de la ectodisplasia, aunque deleciones (pérdidas) del material genéticotambién puedenocurrir.Se hanreportado variasmutaciones en algunospaíses, en México el primer informe de estasalteracionesgenéticas se hizo en el año 2011 por Salas-Alanis; RevMed Chile 2011; 139: 1621-1624.

4.- OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio está diseñado paraidentificar lasmutacionesgénicas en

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México. Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanel.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" UANL

pacientes diagnosticados con displasia ectodérmica ligados al X e investigar la relación de estos resultados con los aspectos clínicos y obtener una base de datos nacionales y ofrecer un asesoramiento genético.

5.- PROCEDIMIENTOS

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que nos autorice interrogarlo y toma de imágenes fotográficas (usted decidirá si acepta su publicación en revistas, internet, o libros), así mismo, se le solicitarán 5 mililitros (una cucharada) de sangre de su brazo, y/o la toma de una muestra de sus carrillos (parte interna de su boca) por medio de un cepillado gentil con un cepillo suave. De las células obtenidas de la sangre y/o mucosa bucal se obtendrá material genético (ADN= ácido desoxirribonucleico) y se procesarán para detectar las posibles mutaciones en sus genes. El diagnóstico de su enfermedad es primordialmente clínico, sin embargo, estamos ofreciendo el análisis genético gratuito de su enfermedad.

6.- ENTRE LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS

Aunque los riesgos de los procedimientos a realizarse en esta investigación son menores, es necesario que los conozca, ya que estos pueden ocurrir.

- Sangrado, hinchazón y/o dolor en el sitio donde se obtiene la muestra de sangre (brazo).
- Infección de la vena llamada "flebitis", siendo una complicación poco frecuente.
- Moretón o coágulo de sangre en el sitio donde se obtuvo la muestra, pudiendo ser en la piel o bien en la mucosa del carrillo bucal.

Título abreviado del Protocolo _____
 Forma de Consentimiento de Investigación _____
 Colocar Fecha y versión del mismo _____
 Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
 Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
 C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.: (81) 8348 1465,
 Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
 www.dermatologia-uanel.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

Para prevenir estas complicaciones, las muestras que obtendremos de usted serán recolectadas bajo condiciones de alta higiene. En caso de que suceda alguna complicación, el equipo médico (investigador, co-investigador) tomará las medidas necesarias para tratarlo adecuadamente, sin costo alguno para Ud. No está de más aclarar que los investigadores son responsables del cuidado y seguimiento médico apropiado de las complicaciones causadas por los procedimientos realizados durante el estudio. Ellos están obligados a dar seguimiento a cada uno de sus pacientes participantes en el estudio hasta que cualquier evento que se llegue a presentar se resuelva o se explique. La frecuencia de evaluación del seguimiento se deja a criterio del investigador. Los investigadores registrarán la frecuencia y naturaleza de los eventos adversos que se presenten. En caso de que usted presente cualquier efecto secundario o lesión notifique a su médico del estudio de inmediato, para que pueda recibir el tratamiento médico adecuado. Asimismo, si Usted decide dejar de participar en forma permanente al estudio no habrá ningún molesto por parte del equipo médico.

7.- LOS BENEFICIOS POTENCIALES DE LA INVESTIGACIÓN/JUSTIFICACION

Su participación en este estudio ayudará a identificar las mutaciones más frecuentes responsables de esta enfermedad en la población mexicana. Un beneficio directo es que usted recibirá consulta de un médico especialista y todos sus estudios de laboratorio y genéticos que se realizarán durante el estudio, de forma gratuita. Asimismo, al conocer el tipo de mutación causante de su enfermedad, le podremos brindar asesoría genética para la planificación familiar, así como poder orientarles sobre la evolución, complicaciones y

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Commutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanel.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

futuros riesgos que puede esperar. La información obtenida de este estudio podrá ayudar a entender mejor las bases genéticas de la displasia ectodérmica.

8.- CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE DATOS

El personal responsable de la investigación guardará su información personal en un expediente clínico y en el archivo de investigación clínica determinado para cada sujeto de investigación. Todo esto permanecerá bajo una estricta confidencialidad. Para mantener en secreto los nombres de los participantes del estudio, se emplearán únicamente sus iniciales y se le asignará un número de código a sus datos. Sólo el investigador principal del estudio y su personal de confianza tendrán acceso a la clave de códigos con la cual será posible conectar los datos del estudio con usted. Asimismo, sus datos podrán ser revisados por algunas autoridades regulatorias de salud, como el Comité de Ética y el Comité de investigación de la Institución sede del estudio. El objetivo de estas revisiones es únicamente asegurar la realización correcta del estudio, de la calidad de los datos y los resultados del estudio. Los resultados del presente estudio se podrán emplear con fines administrativos y/o posiblemente serán publicados en libros o revistas especializadas en medicina con fines educativos. Sin embargo en cualquiera de los casos su identidad nunca será revelada. Asimismo, usted tiene el derecho de solicitar información sobre cualquier dato personal que el Médico del Estudio tenga acerca de usted. Usted también tiene el derecho de solicitar que se corrija cualquier inexactitud en sus datos personales. Toda la información obtenida será almacenada por un periodo de 3 años, una vez finalizado el estudio.

9.- PARTICIPACIÓN EN EL RETIRO

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.: (81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte;

Dr. Julio C. Salas Alanís
Av. Francisco I. Madero y Gonzalitos s/n
Col. Mitras Centro 64460
Tel/fax: 8348-0383/ 8348-9846
Celular: 818 253 59 43.

10.- LAS PREGUNTAS SOBRE LA INVESTIGACIÓN

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con;

Dr. Julio C. Salas Alanís
Av. Francisco I. Madero y Gonzalitos s/n
Col. Mitras Centro 64460
Tel/fax: 8348-0383/ 8348-9846
Celular: 818 253 59 43.

11.- EN EL CASO DE LESIÓN

Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes. Si existe una lesión secundaria al el estudio, el sujeto deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", nuestro servicio de Dermatología y/o el Dr. JulioCesar Salas Alanís.

12.- COSTOS:

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

Los costos del proyecto serán realizados por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario, "José Eleuterio González" y el Dr. Julio Cesar Salas-Alanis.

13.- INCENTIVOS PARA PARTICIPAR

No se ofrecerán incentivos para participar en este proyecto de investigación.

14. GRABACIÓN DE AUDIO O VÍDEO.

No se realizará grabación de video.

15. LAS RAZONES PARA LA EXCLUSIÓN DE ESTE ESTUDIO

La única razón para excluirlo de este estudio es que usted no padezca Displasia ectodérmica.

Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad de Autónoma de Nuevo León. Si usted cree que hay alguna violación a sus derechos como sujeto de investigación, puede comunicarse con el Presidente del Comité,

Dr. José Gerardo Garza Leal
Presidente del Comité de Ética
Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74

Titulo abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanel.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

16.- ACUERDO

Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.

Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.

Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.

Fecha Firma de la Sujeto Nombre en letra de molde

Fecha Firma del Primer Testigo Nombre en letra de molde

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

Fecha Firma del Segundo Testigo Nombre en letra de molde

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante:



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
UANL

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha

Firma de la Persona que Obtuvo el
Consentimiento/Investigador Principal

Nombre en letra de molde

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____



DE-Xlink Versión julio 22, 2012.

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L. México, Tel.:(81) 8348 1465.
Conmutador: (81) 8346 7800, 8346 9400 Ext. 198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologia-uanl.com



12.2 E-mail de aceptación de artículo en la Revista Annals of Dermatology.

From: **Annals of Dermatology** <dermajournal@anndermatol.org>

Date: Fri, Sep 19, 2014 at 8:18 AM

Subject: [AOD-14-166] Your manuscript has been accepted.

To: drjuliosalas@gmail.com

Manuscript ID : AOD-14-166

Manuscript Title : Mutations in EDA and EDAR genes in a large Mexican Hispanic cohort with hypohidrotic ectodermal dysplasia.

Dear Prof. JULIO CESAR SALAS ALANIS:

We are pleased to inform you that the above-mentioned paper has been accepted for publication at Annals of Dermatology.

Please check the final version of your manuscript and upload it in our manuscript submission system.

You should upload your manuscript file and TIFF, ESP, or PPT figure files ,title page as a compressed ZIP file for publication. (Limit 40MB)

The typescript has been forwarded to the manuscript and English editors for further possible revision. You may be requested to answer more queries from them. You will receive a galley proof for your correction from the publisher about a few months in advance of publication. Please return corrections within 5 working days. If you have not submitted 'Authors' assurances and assignment of copyright transfer and disclosure of conflict of interest' to editorial office yet, please send them to the office either by fax or express mail. Without them, we cannot process the editorial work for the publication of your article.

We appreciate you and your colleagues' contribution to the Annals of Dermatology and trust that you will continue to submit your works to the journal in the future.

Annals of Dermatology

#303, Seocho Nasan Suite Office44, Seocho-daero 78-gil, Seocho-gu, Seoul
137-858, Korea.

Tel: 82-2-3473-0284, Fax: 82-2-3472-4203

E-mail: dermajournal@anndermatol.org

12.3 Galera del Artículo aceptado para publicar.

Annals of Dermatology - Manuscript Submission

Manuscript Draft

Manuscript Number: AOD-14-166

Title: Mutations in EDA and EDAR genes in a large Mexican Hispanic cohort with hypohidrotic ectodermal dysplasia.

JC Salas-Alanis,¹⁻² E Wozniak,³ CA Mein,³ C Duran Mckinster,⁴ J Ocampo-

Candiani,¹ DP Kelsell,⁵ R Hua,⁶ ML Garza-Rodriguez,⁷ KA Choate*,⁶ HA Barrera

Saldaña.^{7,8}

1) Dermatology Department, Hospital Universitario, Universidad Autonoma de Nuevo Leon. Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño S/N, Mitras Centro, 64460 Monterrey, Nuevo Leon, Mexico.

2) Basic Science Department, Medicine School, Universidad de Monterrey. Av. Ignacio Morones Prieto, 4500 Pte. 66238 San Pedro Garza Garcia, N.L. Mexico.

3) Barts and the London Genome Centre, John Vane Science Centre, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ.

4) Instituto Nacional de Pediatría Insurgentes Sur 3700-C Col. Insurgentes Cuicuilco Delegación Coyoacán CP 04530 Mexico, D.F.

5) Centre for Cutaneous Research, Blizard Institute, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Whitechapel, London, E1 2AT, UK.

6) Departments of Dermatology and Pathology. Yale University School of Medicine. 333 Cedar Street, New Haven, CT 06510.

7) Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Av. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico.

8) Vitagenesis, SA de CV. Bolulevard Puerta del Sol #1005. Colinas de San Jeronimo, Monterrey, N.L. Mexico 64630.

Mutations in *EDA* and *EDAR* genes in a large Mexican Hispanic cohort with hypohidrotic ectodermal dysplasia. Ectodermal Dysplasias (ED) comprise nearly 200 different genetic conditions identified by lack or dysgenesis of at least two ectodermal derivatives, such as hair, nails, teeth and sweat glands. Hypohidrotic/anhidrotic Ectodermal Dysplasia (HED) is the most frequent form of ED and it can be inherited as an X-linked (XL-HED) (MIM 305100), autosomal recessive (AR HED) (MIM 224900) or autosomal dominant (AD HED)(MIM 229490) condition, and it is caused by mutations in any of the three *ectodispalin* pathway genes: *ectodispalin* (*EDA*), which encodes a ligand for the *EDA* receptor (*EDAR*) and *EDARADD*, an intracellular signaling for this pathway. HED (HED) is characterized by a triad of clinical findings including absent or diminished eccrine sweat glands, missing and/or malformed teeth and thin sparse hair. It also includes dryness of the skin, eyes, airways and mucous membranes as well as other ectodermal defects and, in some cases fever, seizures and rarely, death. XL-HED is caused by mutations in the *EDA* gene (ectodysplasin), located on chromosome Xq12-q13.1 which encodes a signaling molecule of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. AR and AD HED are caused by mutations in the *EDAR* gene (EDA receptor), located on chromosome 2q11.q13 or *EDAR*- Associated Death Domain encoding gene *EDARADD* located in chromosome 1q42-q43¹. Several mutations have been described in different populations in the *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* genes as causing HED. The XL-HED form is the most common and it is responsible of the 90% of the HED cases²⁻⁶. The three forms of HED are clinically indistinguishable and comprehensive evaluation of the Mexican Hispanic population has not being undertaken to date. In the present study, we aimed to characterize the mutations in *EDA*, *EDAR* and *EDARADD* genes present in Mexican Hispanic patients with

HED. Male and female patients (35 families) from different geographical regions of Mexico with features suggestive of HED were enrolled in the study (Figure 1, Supplement). Index cases and their parents were screened for missing or malformed teeth, thin or sparse hair, and nail changes, and all answered questions about sweating, heat intolerance, fever, seizures and past history of siblings deceased for unknown fever during the first year of life. The protocol was approved by the ethics and research committees of the University Hospital of the Autonomous University of Nuevo Leon and Yale University, School of Medicine. After obtaining informed consent, peripheral blood of patients and family members was drawn and DNA was extracted using a phenol-chloroform standard protocol. All exons of *EDA*, *EDAR* and *EDARADD* genes were screened using specific primers as described by Cluzeau et al., 2011 and PCR amplification was performed using Amplitaq Gold (Applied Biosystems) or Kapa 2G Fast polymerase (Kapa Biosystems)². Sequencing reactions were carried out using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) and resulting DNA fragments were sequenced using the 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequencing quality control and assembly were performed using Sequence Scanner V.1.0 (Applied Biosystems) and phred, phrap and consed or Sequencher softwares (Gene Codes)⁷. A total of 40 patients from 35 families were tested for *EDA*, *EDAR* and *EDARADD* mutations. Sequence analysis of all coding exons of *EDA*, *EDAR* and *EDARADD* genes identified 16 different mutations in 21 (60%) families (Table 1). Sixteen different mutations were present, fifteen mutations were found in the *EDA* gene, 5 had previously been reported and 10 were novel. One known mutation was found in the *EDAR* gene. No mutations were found in the *EDARADD* gene in remaining kindreds (14) analyzed and *WNT10A* analysis was not performed. Review of the clinical

features

in the affected patients and female carriers showed no phenotypic correlation with the genotype (data not shown). Ten obligate female carriers displayed dental abnormalities (one missing tooth) that were independent of specific mutations, and that we speculate may be due to random X-inactivation. In studying a Mexican Hispanic Cohort (see results table 1), we have found that 60% bear mutations in *EDA+EDAR* but no mutations in *EDARDD*. Of 16 inherited mutations, ten were novel. Of these novel mutations in *EDA*, p.E36ter is a nonsense mutation that produces a truncated protein and the other nine missense mutations lie in conserved regions of the protein including the furin cleavage site and the TNF-like domain where previous disease-causing mutations have been identified. The nonsense mutations p.E36ter and p.Q128ter produce a truncated and nonsense mediated decay of the ectodysplasin protein³. Missense mutations, p.R150K, p.R155C, and p.R156H disrupt the furin cleavage site, p.G299R, p.C346Y, p.C346W, and p.T378M are predicted to disrupt the protein function⁴⁻⁶. Two novel deletion mutations were present in this population: c.del 546-581 (p.183-194 del) and c.887-900 del, p.297-301delFSx4 as one splice site mutation, c.793+1 G>C. Thirty-three mutations in the *ectodysplasin A-receptor* gene (*EDAR*) gene have previously been reported, mainly missense mutations⁸. We found a homozygous c.G212A, p.C70Y mutation in exon 3 of *EDAR* in an affected father-daughter pair with autosomal recessive HED. This mutation lays within the ligand-binding domain of *EDAR* and is crucial for binding to the ligand⁹. A novel recurrent mutation p.G350D was found in four kindreds, and the previously reported p.R155C

was found in 3 kindred³. This suggests possible independent founder mutations in the Mexican Hispanic population. These first findings in the Mexican Hispanic population

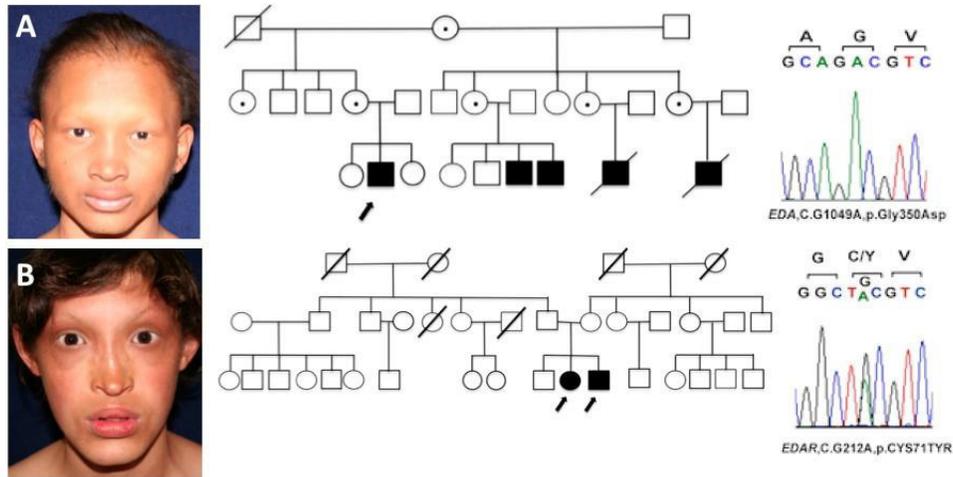
expand the mutation spectrum in *EDA* and *EDAR* in HED, and confirm the clinical diagnosis in a large cohort. Recurrent mutations suggest possible founder mutations which may aid in genetic counseling and prenatal diagnosis in at-risk pregnancies. We also found that newborn febrile seizures are a significant cause of perinatal lethality with 8 deaths in our cohort. An additional benefit of our study is the identification of potential candidates for replacement therapy with recombinant EDA protein (Edimer Pharmaceuticals)¹⁰.

References.

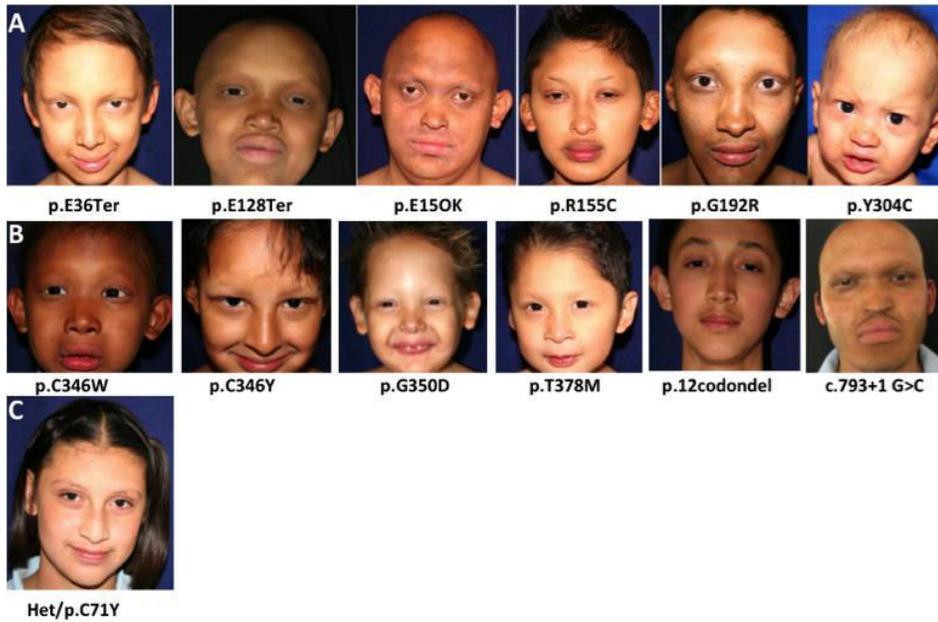
1. Visinoni AF, Lisboa-Costa T, Pagnan NA, Chautard-Freire-Maia EA. Ectodermal Dysplasias: Clinical and Molecular Review. *Am J Med Genet* 2009;149A(9):1980-2002.
2. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M *et al.* Only four genes (*EDA1*, *EDAR*, *EDARADD*, and *WNT10A*) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Human mutation* 2011; 32: 70-2.
3. Schneider P, Street SL, Gaide O *et al.* Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 18819-27.
4. Vincent MC, Biancalana V, Ginisty D, Mandel JL, Calvas P. Mutational spectrum of the *ED1* gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9:355-363.

5. Bashyam MD, Chaudhary AK, Reddy EC *et al.* A founder ectodysplasin A receptor (EDAR) mutation results in a high frequency of the autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia in India. *The British journal of dermatology* 2012; 166: 819-29.
6. Clauss F, Chassing N, Smahi A, Vincent MC, Calvas P, Molla M, Lesot H, Alembik Y, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Manière MC, Schmittbuhl M. X-linked and autosomal recessive Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia: genotypic-dental phenotypic findings from a retrospective study in 24 families. *Clinical Genetics* 2010; 2010 Sep;78(3):257-66.
7. Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 1998;8:175-185.
8. The Human Gene Mutation Database (Internet), Cardiff HGMD; Cardiff. The Human Gene Mutation Database; 2014 (cited 2014 June 20). Available from: <http://www.hgmd.org>
9. Moya-Quiles MR, Ballesta-Martinez MJ, Lopez-Gonzalez V, Glover G, Guillen-Navarro E. A compound heterozygous mutation in the EDAR gene in a Spanish family with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia *Arch Dermatol Res* 2010 302:307–310.
10. Huttner K. Future developments in XLHED treatment approaches. *Am J Med Genet A.* 2014 Mar 26. doi: 10.1002/ajmg.a.36499. [Epub ahead of print].
11. Monreal AW, Zonana J, Ferguson B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. *Am J Hum Genet.* 1998;63:380-9.

13. RamaDevi AR, Reddy EC, Ranjan S, Bashyam MD. Molecular genetic analysis of patients from India with hypohidrotic ectodermal dysplasia reveals novel mutations in the EDA and EDAR genes. Br J Dermatol. 2008;158:163-7.



A) Index case from X-linked pedigree shows multiple male affected offspring. Two of them died of fever during the first month of birth. Mutation analysis reveals a homozygous c.1049G>A, p.G350D mutation. **B)** Male index case from a family with Autosomal Recessive HED. This patient has an heterozygous mutation in Exon 3 c.212 G>A, p.71 C>Y. The clinical findings of these two patients with HED show a sparse hair, frontal bossing, saddle nose, periocular hyperpigmentation and enlarged lips are evident. In our cohort there was no difference between the two forms of inheritance. White symbols indicate unaffected individuals, black squares and circles denote affected, dots indicate obligate carrier females, the proband is in arrows.



Supplements.

Clinical findings in patients with HED.

A-B) XL-HED, clinical variability in male patients analyzed. They show the classical triad of HED, dental abnormalities, anhidrosis/hypohidrosis and thin sparse hair. Some of them has normal hair appearance. **C) Recessive HED** female patient with minor clinical aspect of HED.

12.4 Certificados de Conferencias del tema.



Jefferson
Medical College

TODAY

JEFFERSON INSTITUTE OF MOLECULAR MEDICINE
Department of Dermatology & Cutaneous Biology

LECTURE SERIES

402 BLSB
12:00 NOON - 1:00 P.M.

Monday, November 11, 2013

Guest Lecturer

Julio Salas, M.D.

**Founder and President of the Dystrophic Epidermolysis
Bullosa Research Association, DebRA Mexico
and Yale University**

*"MUTATIONAL ANALYSIS OF THE EDA1 GENE IN MEXICAN PATIENTS WITH
X LINKED HYPOHIDROTIC ECTODERMAL DISPLASIA"*

THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY



La Facultad de Medicina de la UNL a través de la Subdirección de Educación Continua, otorga el presente

RECONOCIMIENTO

Dr. Julio César Salas Alanís

Por su participación como PROFESOR con el tema
"Displasia ectodérmica anhidrótica"
en las

"Sesiones Académicas 2013-2014"
de la Sociedad de Dermatología de Nuevo León, A.C.

Realizadas en el Hotel Sañ Valle de mayo de 2014 a marzo de 2015.

"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, N.L., 4 de septiembre de 2014.




Dr. med Santos Guzmán López
DIRECTOR


Dr. Félix Ramón Cedillo Salazar
SUBDIRECTOR DE EDUCACIÓN CONTINUA





XXX Congreso Mexicano de Dermatología

La Sociedad Mexicana de Dermatología, A.C. otorga la presente
Constancia a:
DR. JULIO SALAS ALANIS

Por su participación como **PONENTE** en la conferencia titulada:
MUTACIONES EN PACIENTES MEXICANOS CON DISPLASIA ECTODÉRMICA HIPOHIDROTICA

Celebrado en el Poliforum de la Ciudad de León, Guanajuato
del 6 al 9 de Agosto del 2014

Avalado por:



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO
Campus León



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO


UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Dr. Carlos Hidalgo, Villalón de Saldaña
Director de la División de Ciencias de la Salud
de la Universidad de Guanajuato


Dra. Rosa María Gutierrez Vidrio
Presidenta de la Sociedad Mexicana
de Dermatología, A.C.


Dra. María del Carmen Padilla Desgarranes
Secretaría de la Sociedad Mexicana
de Dermatología, A.C.



COLEGIO DE DERMATOLOGIA DE TIJUANA, A.C.

RECONOCIMIENTO

Dr. Julio Cesar Salas Alanis

Por su brillante participación en su ponencia
"DISPLASIAS ECTODÉRMICAS"

MESA DIRECTIVA

Dr. Rodrigo Madrigal
Presidente

Dra. Alhely Niebla Maldonado
Secretaria

Dra. Gloria Margarita López Wence
Vicepresidenta

Tijuana, B.C. AGOSTO 28 2014

12.5 Imágenes pictóricas del proceso de esta tesis.

Primera obtención de muestras en la Reunión de pacientes con DEH en Tonalico, Estado de México. Julio 2012.



Proyectos

PROYECTO:

Detección de mutaciones de los pacientes con DE ligadas al cromosoma X

El Doctor Julio Salas Alanís, médico egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León con especialidad en dermatología por la Universidad de Guadalajara, se comprometió a realizar una investigación médico académica respecto de las displasias ectodérmicas en conjunto con las familias afiliadas a la AMDEM, en donde se pretende detectar alteraciones en los genes (mutaciones) con la finalidad de saber quienes son portadores y clasificar el síndrome de acuerdo a la herencia.

AVANCES:

Se llevó a cabo la toma de muestras de sangre y/o saliva de las familias que voluntariamente aceptaron ser parte de la investigación. Dichas muestras quedaron a cargo del Dr. Julio Salas quien realizará las pruebas necesarias para la investigación.

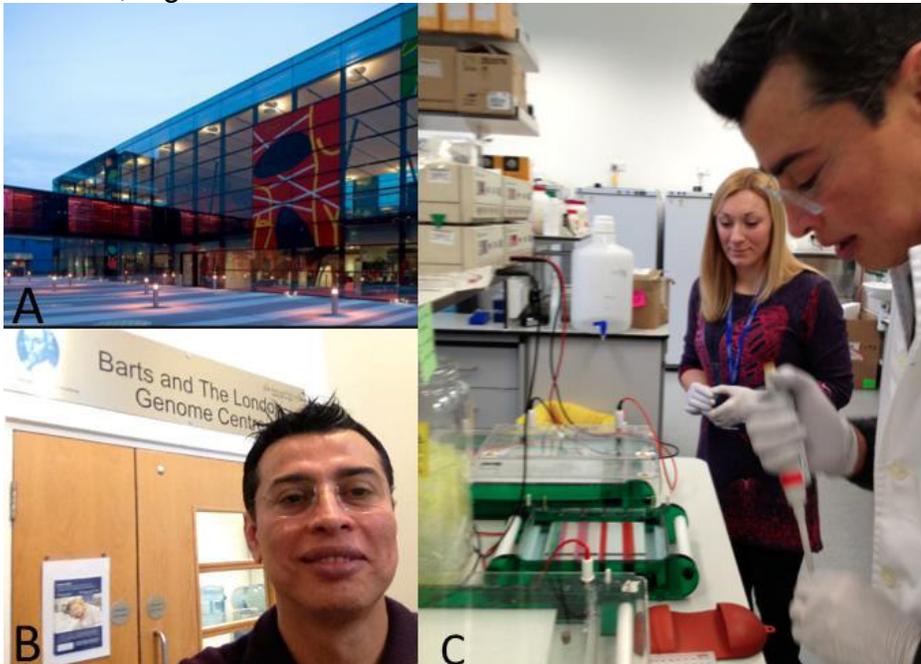
Informe Reunión Anual AMDEM 2012. 16

Monterrey Nuevo León México, Agosto-Octubre 2012.



Extracción de ADN con la ayuda y enseñanza de la T.L.C Daniela E. Monsivaís y la Dra. Lourdes Garza. en la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

Londres, Inglaterra Enero-Febrero 2013.



Edificio del Instituto Blizard de Londres Inglaterra y del Hospital de Londres y Barts así como el Centro del Genoma en Londres Inglaterra en donde se llevaron a cabo las primeras detecciones de mutaciones en el gen *EDA1*. En la imagen Eva Wozniak enseñándome lo básico de la formación de productos del PCR.

Departamento de Dermatología, Universidad de Yale, New Haven, Connecticut, US. Abril 2013-Junio 2014.



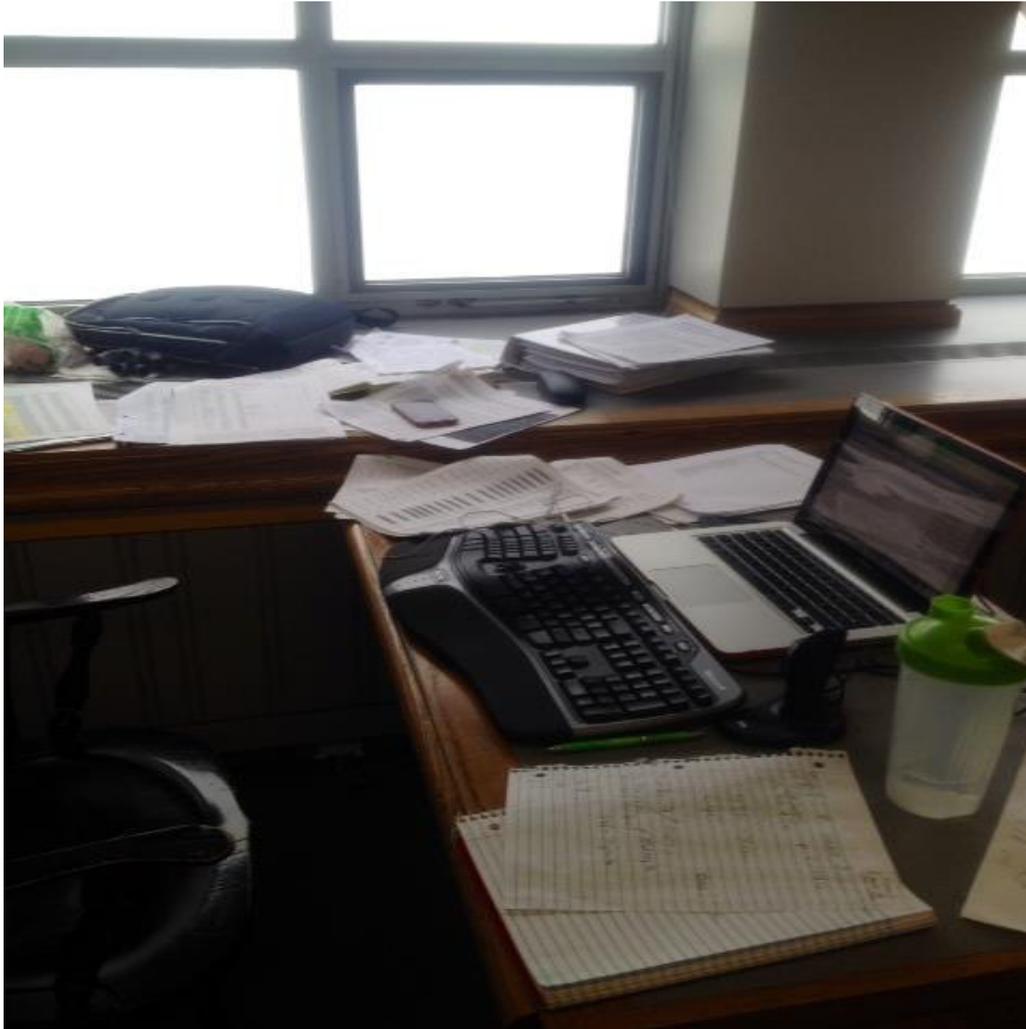
Campus de la Universidad de Yale, con mi asesor externo el Ph.D Keith Choate. Fue en esta Universidad en donde se detectaron mutaciones inéditas en los pacientes con Displasia Ectodérmica Hipohidrótica ligada al cromosoma X.

Universidad de Bard en Red Hook, Nueva York. Abril 2013-Junio 2014.



Paisajes que me inspiraron y motivaron a terminar la tesis doctoral.

*Biblioteca de la Universidad del Colegio de Bards en Red Hook Nueva York.
Junio 26, 2014.*



“Finalizando el escrito del artículo para publicar, el último día en la biblioteca de la Universidad del Colegio Bards, Up-State, Nueva York, US”.

12.6 BIOGRAFÍA.

El Dr. Julio César Salas Alanis, es Médico Cirujano Partero egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León generación 1980-1987. Realizó estudios de Dermatología en el Instituto Dermatológico de Jalisco de 1989-1991, emigró a Barcelona España para realizar la subespecialidad de Dermatopatología en el Hospital Clinic I Provincial de la Universidad de Barcelona, España de 1991-1992. Ha realizado múltiples estancias y proyectos de Investigación en Universidades y Hospitales de Reino Unido: Kings Collague, Saint Thomas's Hospital, el Hospital Royal de Londres, el Instituto Blizzard del Reino Unido y en Estados Unidos incluyendo las Universidades de Columbia en Nueva York, la Universidad de Stanford Los Angeles, la Universidad de Jefferson en Filadelfia y finalmente un año académico en la Prestigiada Universidad de Yale, en New Haven Connecticut, EUA, en donde realizó parte de esta tesis doctoral.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde el año 2000, pertenece a la Academia Nacional de Medicina, Academia Mexicana de Ciencias, y un sin fin de Sociedades y Academias Nacionales y extranjeras de Dermatología.

Cuenta con una producción científica de más de 100 artículos en extenso, de los cuales más de 50 se encuentran indexados en revistas con factores de impacto hasta 14. Sus líneas de investigación son las Genodermatosis, incluyendo: Epidermólisis Bullosa, Hipertrichosis Congénita, Ictiosis, Tricotiodistrofia, y recientemente las Displasias Ectodérmicas. Ha realizado aportaciones al genoma humano Mexicano, incluyendo mutaciones inéditas y publicando locus para enfermedades heredadas del pelo.

Es fundador de la Asociación DebRA México AC, (Dystrophic Epidermolysis Bullous Research Association) encargada del cuidado, educación de los pacientes mexicanos con epidermolisis bullosa congénita.

Ha laborado en las tres mejores Universidades del Noreste del país: Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Universidad Autónoma de Nuevo León y actualmente es Profesor e Investigador de Ciencias Básicas y Dermatología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Monterrey, Nuevo León México en donde dirige el Centro de Medicina Molecular y Medicina Personalizada así como el laboratorio de inmunofluorescencia cutánea para el diagnóstico de enfermedades ampollosas autoinmunes y genéticas.

XIII BIBLOGRAFIA.

1. García-Martín P, Hernández-Martín A, Torrelo A. Ectodermal Dysplasias: A Clinical and Molecular Review. *Actas Dermosifiliogr.* 2012 Oct 25. pii: S0001-7310(12)00407-3. doi: 10.1016/j.ad.2012.07.012. [Epub ahead of print]).
2. Solomon LM, Keuer EJ. The ectodermal dysplasias. Problems of classification and some newer syndromes. *Arch Dermatol.* 1980 Nov;116(11):1295-9.
3. Marta Pinheiro and Newton Freire-Maia. Ectodermal Dysplasias: A Clinical Classification and a Causal Review. *American Journal of Medical Genetics* 1994;53:153-162).
4. Priolo M, Silengo M, Lerone M, Ravazzolo R. Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep. *Clin Genet.* 2000 Dec;58(6):415-30.
5. Priolo M, Laganà C. Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification. *J Med Genet.* 2001 Sep;38(9):579-85,
6. Lamartine J. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. *Clin Exp Dermatol.* 2003 Jul;28(4):351-5,
7. Itin PH, Fistarol SK. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004 Nov 15;131C(1):45-51.
8. DiGiovanna JJ, Priolo M, Itin P. Approach towards a neclassification for ectodermal dysplasias: integration of the clinical and molecular knowledge. *Am J Med Genet A.* 2009 Sep;149A(9):2068-7
9. Priolo M. Ectodermal dysplasias: an overview and update of clinical and molecular-functional mechanisms. *Am J Med Genet A.* 2009 Sep; 149A (9):2003-13.

10. Chassaing, N., Vincent, M.-C., Viot, G., Clauss, F., Maniere, M.-C., and 11 others. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum. Mutat.* 32: 70-77, 2011)
11. Bayés M, Hartung AJ, Ezer S, Pispá J, Thesleff I, Srivastava AK, Kere J. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet.* 1998 Oct;7(11):1661-9.
12. Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet.* 1999 Aug;22(4):366-9.
13. Turnam J. Two cases in which the skin, hair and teeth were very imperfectly developed. *Med Chir Trans.* 1848; 31:71-82).
14. Kishore M, Panat SR, Aggarwal A, Agarwal N, Upadhyay N, Ajai K, Alok A. Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia (ED): A Case Series. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:273-5.
15. Mokhtari S, Mokhtari S, Lotfi A. Christ-siemens-touraine syndrome: a case report and review of the literature. *Case Rep Dent.* 2012; 2012:586418
16. Segurado Rodríguez MA, Ortiz De Frutos FJ, Cornejo Navarro P, Rodríguez Peralto JL, Sánchez Del Pozo J, Guerra Tapia A, Iglesias Díez L. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: A cause of fever of unknown origin. *An Esp Pediatr.* 2002;56:253-7.
17. Fete M, Hermann J, Behrens J, Huttner KM. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED): Clinical and diagnostic insights from an international patient registry. *Am J Med Genet A.* 2014 Mar 24.

18. Yildirim M, Yorgancilar E, Gun R, Topcu I. Ectodermal dysplasia: otolaryngologic evaluation of 23 cases. *Ear Nose Throat J.* 2012; 91:E28-33.
19. Daniel E, McCurdy EA, Shashi V, McGuirt WF Jr. Ectodermal dysplasia: otolaryngologic manifestations and management. *Laryngoscope.* 2002;112:962-7.
20. Dietz J, Kaercher T, Schneider AT, Zimmermann T, Huttner K, Johnson R, Schneider H. Early respiratory and ocular involvement in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Pediatr.* 2013; 172:1023-31.
21. Zonana J. Hypohidrotic (anhidrotic) ectodermal dysplasia: molecular genetic research and its clinical applications. *Semin Dermatol.* 1993 Sep;12(3):241-6.).
22. (Mary Nguyen-Nielsen et al en *Eur J Med* (Nguyen-Nielsen M, Skovbo S, Svaneby D, Pedersen L, Fryzek J. The prevalence of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) in Denmark, 1995-2010. *Eur J Med Genet.* 2013 Feb 14.
23. Pinheiro M, Freire-Maia N. Christ-Siemens-Touraine syndrome--a clinical and genetic analysis of a large Brazilian kindred: II. Affected males. *Am J Med Genet.* 1979;4(2):123-8.
24. Pinheiro M, Freire-Maia N. Christ-Siemens-Touraine syndrome--a clinical and genetic analysis of a large Brazilian kindred: III. Carrier detection. *Am J Med Genet.* 1979;4(2):129-34.
25. Pinheiro M, Freire-Maia N. Christ-Siemens-Touraine syndrome--a clinical and genetic analysis of a large Brazilian kindred: I. Affected females. *Am J Med Genet.* 1979;4(2):113-22.

26. Blüschke G, Nüsken KD, Schneider H. Prevalence and prevention of severe complications of hypohidrotic ectodermal dysplasia in infancy. *Early Hum Dev.* 2010;86:397.
27. Anoop TM, Simi S, Mini PN, Ramachandran M, Jabbar PK, Raja-kumari PK, et al. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Assoc Physicians India.* 2008; 56:268-70.
28. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, *et als.* Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat* 2011, 32:70-72.
29. Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P: Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 1998. 8:175-185.
30. Gordon, D., C. Abajian, and P. Green. 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research.* 1998, 8:195-202.
31. Pascal Schneider, Summer L. Street, Olivier Gaide, Sylvie Hertig, Aubry Tardivel, Jürg Tschopp, Laura Runkel, *et al.* Mutations Leading to X-linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Affect Three Major Functional Domains in the Tumor Necrosis Factor Family Member Ectodysplasin-A. *Biol. Chem.* 2001, 276:18819-18827.
32. Vincent MC1, Biancalana V, Ginisty D, Mandel JL, Calvas P. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia *Eur J Hum Genet.* 2001 May;9(5):355-63.
33. AW, Zonana J, Ferguson B Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. *Am J Hum Genet.* 1998 Aug;63(2):380-9.
34. Fan H1, Ye X, Shi L, Yin W, Hua B, Song G, Shi B, Bian Z. Mutations in the EDA

gene are responsible for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and hypodontia in

Chinese kindreds. *Eur J Oral Sci.* 2008 Oct;116(5):412-14.

35. RamaDevi AR, Reddy EC, Ranjan S, Bashyam MD. Molecular genetic analysis of patients from India with hypohidrotic ectodermal dysplasia reveals novel mutations in the EDA and EDAR genes. *Br J Dermatol.* 2008 Jan;158(1):163-7.

36. Clauss F, Chassaing N, Smahi A, Vincent MC, Calvas P, Molla M, et al. X-linked and autosomal recessive Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia: genotypic-dental phenotypic findings. *Clin Genet.* 2010 Sep;78(3):257-66.

37. Ferguson BM, Thomas NS, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Zonana J. Scarcity of mutations detected in families with X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: diagnostic implications. *J Med Genet* 1998;35:112-115.

38. Banner DW¹, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993 May 7; 73(3):431-45.

39. Saider A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends un Genetics* 2004;30:24-31.