



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"PARTICIPACION DEL GEN p63 EN LA ETIOLOGIA DE LA
ECTRODACTILIA SINDROMATICA Y AISLADA EN
HUMANOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

VALERIA BERDON ZAPATA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Valeria Berdón Zapata.

FECHA: 14 Jun/2004

FIRMA:

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Participación del Gen p63 en la Etiología de la Ectrodactilia
Sindromatica y Aislada en Humanos"

realizado por Valeria Berdón Zapata

con número de cuenta 09959916-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en C. Juan Carlos Zenteno Ruíz

Propietario Dra. Maricela Villagran Santa Cruz

Propietario Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Suplente M. en C. Maria Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente M. en C. Antonio Miranda Duarte

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Quiero dedicar esta tesis a:

A tí mamá por tu amor, por tus enseñanzas y tu apoyo; eres mi ejemplo de integridad y fortaleza.

A tí papá por tanto cariño, por tus consejos y por tu forma de ser. Y por haberme regalado, junto con Elena tu esposa, la hermosa experiencia de tener un hermano: Daniel.

A mi abuelo Victor que siempre tengo presente y a quien quiero muchísimo, así como a mi abuela Benny, la cual vivirá siempre en mi corazón.

A tí Miguel, por ser hoy parte de mi vida.

A mis amigos, fuente de alegría: Nadihelli, Belem, Edith, Mónica, Iván, Alfonso, Ricardo.

A todos los que forman parte del laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Wendy, Elsa, Jorge, Gerardo, Roxana y Paty; a la Doctora Gensebatt, gracias por su apoyo y por confiar en mí.

A Juan Carlos, mi tutor, a quien agradezco su impulso, su amistad y lo aprendido con él.

Y a todos los que han contribuido con un ratito de su tiempo a la formación de mi persona.

Sentí la gran fuerza que me empujaba
a coger la pluma y a decirte "Gracias"

"Lo que convierte la vida en una bendición no es hacer lo que nos gusta,

sino que nos guste lo que hacemos"

(GOETHE)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1. Desarrollo embrionario de las extremidades.....	12
2.2. La Cresta Apical Ectodérmica.....	20
2.3. El gen p63.....	22
2.4. Malformaciones en extremidades: La Ectrodactilia.....	28
3. OBJETIVO.....	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
5. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	33
6. METODOLOGÍA.....	35
6.1. Extracción de ADN de sangre periférica.....	35
6.2. Determinación de la concentración y pureza del ADN obtenido.....	36
6.3. Amplificación por PCR del gen p63.....	36
6.4. Análisis de los productos amplificados.....	38
6.5. Purificación y cuantificación de los productos de amplificación.....	38
6.6. Secuenciación automatizada de los productos de PCR.....	40
7. RESULTADOS.....	41
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIONES.....	53
9.1. Comentarios.....	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54
11. ANEXO I. ARTÍCULO PUBLICADO.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Centros de control del desarrollo de la extremidad y sus moléculas mediadoras.....	15
TABLA 2.	Características clínicas y diagnóstico de los sujetos incluidos en el estudio.....	34
TABLA 3.	Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación por PCR de los 16 exones del gen p63.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Elementos esqueléticos en extremidades de diversos grupos de tetrápodos.....	10
FIGURA 2.	Localización de los primordios de extremidades superiores e inferiores en el flanco embrionario.....	13
FIGURA 3.	Formación del primordio de la extremidad y formación de la Cresta Apical Ectodémica.....	16
FIGURA 4.	Niveles de expresión de genes Hoxa y Hoxd en relación con los componentes esqueléticos de la extremidad.....	17
FIGURA 5.	Microfotografías electrónicas de barrido de la estructura de la Cresta Apical Ectodérmica.....	20
FIGURA 6.	El gen p63 y sus isoformas.....	24
FIGURA 7.	Fenotipo del ratón “knockout” para el gen p63.....	27
FIGURA 8.	Distribución de mutaciones en p63.....	31
FIGURA 9.	Diagrama del dominio DBD de p63, basado en la estructura de p53.....	32
FIGURA 10.	Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% con los productos de amplificación del exón 7 de seis pacientes.....	38
FIGURA 11.	Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% para la cuantificación de los productos de amplificación del exón 5 de seis pacientes.....	39
FIGURA 12.	Mutación del gen p63 en el paciente número 1.....	43
FIGURA 13.	Mutación del gen p63 en el paciente número 11.....	44
FIGURA 14.	Mutaciones del gen p63 en las pacientes 9 y 10 (madre e hija).....	45
FIGURA 15.	Mutación del gen p63 en el paciente número 14.....	46

ABREVIATURAS

AER	Cresta Apical Ectodérmica (<i>Apical Ectodermal Ridge</i>).
ZAP	Zona de Actividad Polarizante.
PZ	Zona de Progreso (<i>Progress zone</i>).
SHFM	Ectrodactilia aislada (<i>Split hand split foot malformation</i>).
EEC	Síndrome de Ectrodactilia-Displasia Ectodérmica- Labio/paladar Hendido (<i>Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia- Cleft lip/palate</i>).
LMS	Síndrome extremidad-mamario (<i>Limb-Mammary Síndrome</i>).
ADULT	Síndrome <i>Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth</i> .
EE	Síndrome de Ectrodactilia con Displasia Ectodérmica (<i>Ectrodactyly Ectodermal dysplasia</i>).
AEC	Síndrome de Anquiloblefaron-Displasia Ectodérmica y Labio Hendido (<i>Ankyloblepharon Ectodermal dysplasia Cleft lip</i>).
TA	Dominio de transactivación de la proteína p63.
DBD	Dominio de unión al ADN de la proteína p63.
ISO	Dominio de tetramerización terminal de la proteína p63.
SAM	Dominio α -esteril para interacciones proteína-proteína.
TID	Dominio inhibidor de la transcripción.
Δ N	Isoforma de la proteína p63 sin el dominio de transactivación .
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).

RESUMEN

Junto con el origen de los primeros vertebrados terrestres surgió una novedad evolutiva que les permitiría a los primeros tetrápodos desplazarse fuera del agua; esta novedad fue la aparición de extremidades.

La formación de estas estructuras se lleva a cabo de acuerdo a un plan maestro que se va revelando de manera secuencial. En el humano, este proceso inicia cuando un grupo de células mesodérmicas en un lugar específico del flanco del embrión es activado alrededor de la cuarta semana de gestación, con esto se inician una serie de señalizaciones moleculares e interacciones entre proteínas que inducen, de manera secuencial, la formación de la extremidad. El crecimiento y desarrollo de esta estructura se lleva a cabo con base en tres ejes lineales de simetría espacial denominados Próximo-distal, dorso-ventral y antero-posterior. Para el crecimiento de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal es necesaria la existencia de una estructura epitelial formada por múltiples capas de ectodermo llamada **Cresta Apical Ectodérmica (AER)**. La AER se encarga de promover y controlar el estado de proliferación e indiferenciación de las células que formarán los miembros.

El gen p63 juega un papel importante durante el establecimiento, diferenciación y mantenimiento de la AER. Este gen se localiza en el cromosoma 3q27-29 y pertenece, junto con p73, a la familia del gen supresor de tumores p53. P63 codifica más de 6 proteínas diferentes que son el resultado de dos sitios de inicio de la transcripción y de diferentes tipos de *splicing*.

Otras de las funciones que se le atribuyen a p63 son el mantenimiento del estado de proliferación de las células basales en la epidermis y una adecuada señalización ectodermo-mesénquima necesaria para la formación de estructuras derivadas del ectodermo, como folículos pilosos, dientes, uñas, glándulas sudoríparas y glándulas mamarias.

Recientemente se han relacionado mutaciones en este gen con diversos síndromes autosómicos dominantes que presentan malformaciones en extremidades asociados a defectos en estructuras derivadas del ectodermo. Algunos de estos síndromes son: la Ectrodactilia-Displasia Ectodérmica-Labio/paladar Hendido (**EEC**, por su nombre en inglés *Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate*), el *Limb-Mammary Syndrome* (**LMS**), el síndrome *Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth* (**ADULT**), la ectrodactilia con displasia ectodérmica (**EE**); además del síndrome de displasia ectodérmica con labio hendido y anquiloblefaron (fusión congénita de los párpados) llamado **AEC**.

En este estudio se realizó un análisis genético de la región codificante del gen p63 en 14 sujetos mexicanos, 5 con ectrodactilia sindromática y 9 con ectrodactilia aislada.

En cuatro de los 5 individuos con ectrodactilia sindromática se identificaron mutaciones heterocigotas puntuales, previamente reportadas en estudios hechos con otras poblaciones. Uno de estos sujetos con mutación en p63, además de presentar características típicas del síndrome **EEC** presentó anquiloblefaron, característica del síndrome **AEC**.

Este solapamiento de caracteres fenotípicos contradice la recientemente propuesta correlación genotipo-fenotipo, que establece un patrón y tipo de mutaciones generalmente distinto para cada enfermedad.

Se detectó una mutación *de novo* en un caso de ectrodactilia aislada, la primera descrita dentro del dominio **TA** de la proteína (**R97C**). En 8 de los 9 casos con ectrodactilia aislada no se detectó ninguna mutación dentro del gen estudiado, lo cual confirma que mayoría de los casos con ectrodactilia aislada no se asocia a mutaciones en p63.

1. INTRODUCCIÓN

Con la aparición de los primeros vertebrados terrestres durante el periodo Devónico superior hace aproximadamente 360 millones de años, se originó un nuevo grupo de seres vivos llamado Tetrapoda (actualmente anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Este grupo desarrolló dos caracteres que resultarían vitales para permitir la subsiguiente evolución de la vida terrestre: pulmones y apéndices pareados.

El Devónico fue una época de temperaturas suaves, con periodos alternos de inundaciones y sequías. Fue en esta época cuando aparecieron los apéndices que permitieron el desplazamiento de los primeros tetrápodos de un charco a otro, separándose este nuevo grupo del de los peces.

Aunque pareciera a simple vista que las aletas de los peces son muy distintas de las extremidades articuladas de los tetrápodos, análisis cladísticos demuestran que el grupo hermano de los tetrápodos es un grupo de peces de aletas lobuladas (sarcopterigios) que vivieron en el Devónico tardío (Ahlberg y Milner, 1994; Ahlberg, 1995). Si se hace un examen detenido de los elementos óseos de las aletas pares de estos peces, se pueden observar características que semejan a las extremidades equivalentes de los anfibios. En consecuencia, los análisis filogenéticos y morfológicos sostienen la hipótesis de que los apéndices de los tetrápodos descienden de las aletas de los peces con aletas lobuladas.

Algunos de los primeros anfibios conocidos del Devónico son: Ichthyostega, Acanthostega y Tulerpeton. Acanthostega tenía patas bien formadas, con dedos completos tanto en las extremidades traseras como en las delanteras, aunque estos miembros aún no le permitían levantar su cuerpo de la superficie para caminar realmente, pues estaban débilmente constituidos.

Si bien hasta hace poco tiempo se creía que los primeros tetrápodos tuvieron cinco dedos en sus manos y pies (esquema pentadáctilo básico de casi todos los tetrápodos actuales), los fósiles del Devónico demostraron que realmente tuvieron entre 6 y 8 dígitos y no fue si no hasta más tarde que el modelo pentadáctilo se estabilizó en los distintos linajes de tetrápodos (Hinchliffe, 2002).

El proceso de evolución fue modificando estos apéndices y se produjo una gran variación en su forma y tamaño, lo que les permitiría ser utilizados para distintas funciones desde cavar hasta correr o volar. Sin embargo, a pesar de estas adaptaciones funcionales, la organización fundamental de las extremidades se encuentra muy bien conservada desde los anfibios hasta los mamíferos. Esto se puede evidenciar debido a que el número y la disposición de los elementos esqueléticos que se tiene en la extremidad es similar en todos los grupos de tetrápodos: se posee en la región proximal pegada al cuerpo un solo elemento esquelético (estilópodo), en la región intermedia se tienen dos elementos (zeugópodo), mientras que la región distal contiene un número variable de elementos esqueléticos que formarán no más de 5 dígitos (autópodo) (FIG.1).

Esto revela la existencia de algún mecanismo básico en el desarrollo de la extremidad, con algunas variaciones, que dan como resultado una diversidad morfológica y funcional en los apéndices de vertebrados.

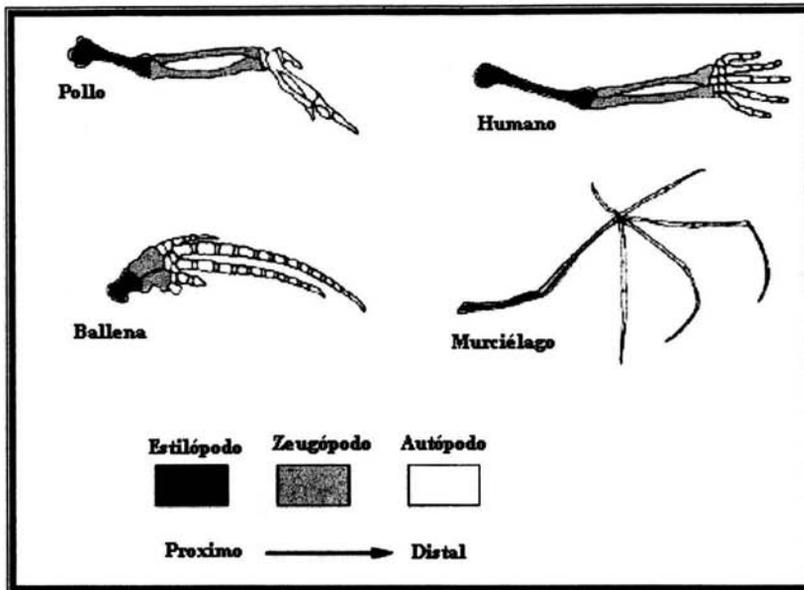


FIGURA 1. Elementos esqueléticos en las extremidades de diversos grupos de tetrápodos con alas, aletas o brazos. (Tomado de Capdevila e Izpisúa, 2001)

La mayor parte del conocimiento generado acerca de los mecanismos que gobiernan el desarrollo de las extremidades en vertebrados se basa en estudios realizados en anfibios y pollos. Tales estudios han demostrado que las regiones tisulares importantes, de las que emanan moléculas clave para el desarrollo, se encuentran conservadas a través de diversas especies como la mosca, el ratón y el humano.

De igual manera, existen similitudes en los lugares de expresión y función de los genes que controlan la organización del ala de una mosca o de un pollo. Existen procesos genéticos que funcionaron bien y por eso se han conservado durante la evolución. Estos mecanismos genéticos y del desarrollo compartidos pueden ser los responsables de la homología estructural en las extremidades de anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Capdevila e Izpisúa, 2001; Hinchliffe, 2002).

Del mismo modo, los cambios en la expresión espacial y temporal de genes que controlan el desarrollo de las extremidades como el Factor de crecimiento de fibroblastos (Fgf), *sonic hedgehog* (Shh), el homólogo de *Wingless* en la mosca *Drosophila* (Wnt) y genes de la familia Hox, podrían ser los responsables de los cambios adaptativos en estas estructuras (Freeman y Herron, 2001).

Un estudio realizado por Paolo Sordino y colaboradores en el año de 1995 (Sordino *et al.*, 1995) demostró que la expresión genética en los apéndices de tetrápodos y peces es muy parecida en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, conforme el desarrollo continúa, se van suscitando diferencias importantes en la expresión de los genes que forman las extremidades en los dos grupos. Por ejemplo: existe una expresión tardía de los genes Hox y Shh en los apéndices del ratón, mientras que esto no ocurre en las aletas del pez zebra, en donde más bien, el ectodermo se comienza a plegar y el desarrollo se detiene después de haber formado el zeugopodo (tibia y fibula). La expresión tardía de Hox y Shh parece ser, entonces, una novedad evolutiva que pudo haber provocado la aparición de las primeras manos o pies (Freeman y Herron, 2001). De esta manera es posible proponer un modelo de evolución de las extremidades por medio de la comparación de los patrones de expresión y función de genes homólogos en el desarrollo de diferentes taxa.

En los últimos años, la integración de conocimientos de diversas disciplinas como la embriología, la biología celular y molecular, la genética y la biología evolutiva ha hecho posible el reconocimiento de interacciones celulares y moleculares que intervienen en el origen, la formación y el crecimiento de las extremidades durante el desarrollo embrionario. A su vez, este conocimiento origina una mejor comprensión de los mecanismos que provocan diversas anomalías en el desarrollo de estas estructuras.

2. ANTECEDENTES

2.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS EXTREMIDADES

Durante la gastrulación se llevan a cabo una serie de migraciones celulares a posiciones en las cuales se dará origen a tres capas celulares importantes para la formación del embrión: el ectodermo (capa externa), el mesodermo (capa media) y el endodermo (capa interna). El ectodermo dará origen a la epidermis y estructuras asociadas, una porción de esta capa de células formará además el sistema nervioso. El mesodermo formará las estructuras asociadas al movimiento y soporte, como lo son músculos, cartílagos y huesos; asimismo formará tejido conectivo y sangre. De esta misma capa se originan el sistema reproductivo y los riñones.

Del endodermo se forman los tejidos y órganos asociados con el sistema respiratorio y digestivo. De igual forma, la glándula tiroides, el hígado, el páncreas y la vesícula biliar surgen de esta capa embrionaria (Larsen, 1998).

Las extremidades se desarrollan de acuerdo a un plan maestro que se va revelando de forma secuencial en cada etapa de la formación del apéndice. Su formación durante el desarrollo embrionario comienza en un lugar y tiempo específicos con la activación de un grupo de células mesenquimatosas en el mesodermo somático de la placa lateral alrededor de la cuarta semana de gestación. El esbozo inicial de la extremidad es una masa de células mesodérmicas indiferenciada localizada en una zona definida del flanco del embrión, cubierta por una capa de ectodermo (FIG.2) (Carlson, 2000).



FIGURA 2. Localización de los primordios de extremidades superiores e inferiores en niveles específicos del flanco embrionario. (Tomada de Mariani y Martin, 2003)

Experimentos moleculares realizados en pollos sugieren que existe una activa interacción entre proteínas de tipo Fgf y Wnt durante el inicio del desarrollo de las extremidades. Por ejemplo, durante la formación del miembro anterior, la expresión de Wnt2b es restringida a la zona del mesodermo intermedio de la placa lateral; ésta proteína parece localizar la expresión de Fgf10 (vía señalización por β -catenina) en el mesénquima de la placa lateral en donde después se formará el miembro (Kawakami *et al.*, 2001).

Fgf10, es necesario para la inducción de Fgf8 en el ectodermo, específicamente, en una estructura epitelial bien localizada encargada de regular una parte importante del desarrollo de la extremidad llamada **Cresta Apical Ectodérmica (AER)**.

La interacción del mesodermo con el ectodermo de la yema del miembro es importante para el control de su desarrollo ya que contiene la información suficiente para la formación de la extremidad, siendo el mesodermo el que determina la morfología general. Durante este proceso, la integridad de la lámina basal (capa de células epiteliales que separa al ectodermo del mesénquima) parece ser importante para una correcta interacción mesodermo-ectodermo y el

desarrollo normal de la AER, debido a que, modelos murinos con una delección homocigota en el gen que codifica para laminina α -5 (principal glicoproteína presente en la lámina basal) experimentan una alteración local de la AER y exhiben sindactilia secundaria (Capdevila e Izpisúa, 2001)

La formación de una extremidad se puede definir con base en tres ejes lineales de simetría espacial, que se van fijando de manera secuencial durante su desarrollo:

- Eje dorso-ventral (dorso de la mano o del pie y palma de la mano o planta del pie, respectivamente).
- Eje antero-posterior (desde el primer dedo hasta el quinto).
- Eje próximo-distal (desde la base del miembro hasta la punta de los dedos).

En las primeras etapas del desarrollo de la extremidad es cuando se comienza a fijar el eje dorso-ventral del campo morfogénético. El ectodermo del dorso, estimulado por el mesodermo, comienza a expresar el gen *Wnt7a* que a su vez promueve la expresión de *Lmx-1* en el mesodermo subyacente. Mientras, el ectodermo ventral comienza a expresar la proteína *En-1*, que inhibe la expresión de *Wnt7a* en esta región.

Parece ser que las proteínas morfogénéticas de hueso (Bmps) están involucradas igualmente en la asignación del destino ventral de las células del mesodermo y del ectodermo por medio de la proteína ΔN -p63 α , que actúa como represor del destino dorsal o neural (van Bokhoven, Brunner, 2002).

Posteriormente, el ectodermo localizado en la frontera entre el ectodermo dorsal y el ventral se comienza a engrosar, formando una cresta a lo largo del plano antero-posterior del borde de la yema. Esta zona es la **AER** y se encarga de promover el crecimiento del miembro a lo largo del eje próximo-distal por medio de la secreción de FGF-2 y FGF-4. Las células del mesodermo que la subyacen se encuentran en un estado de crecimiento e indiferenciación continuos, formando un área llamada zona de progreso (**PZ**). Las células de esta región se caracterizan por expresar el gen *Msx-1*.

La expresión de *Fgf10* en el mesodermo promueve la síntesis de *Fgf8* y de *Radical fringe* (*Rfng*) en la **AER**, lo que a su vez estimula la expresión de *Shh* en las células mesodérmicas de la base posterior de la yema, las cuales forman la zona de actividad polarizante (**ZAP**) que se encarga de organizar la formación de la extremidad a lo largo de su eje antero-posterior (Mahmood *et al.*, 1995; Moon y Capecchi, 2000) (TABLA 1).

EJE	CENTRO DE EMISIÓN DE SEÑALES	SEÑAL MOLECULAR
Proximodistal	AER	Fgf-2, Fgf-4, Fgf-8
Anteroposterior	ZAP	Shh
Dorsoventral	Ectodermo dorsal	Wnt-7a
	Ectodermo ventral	En-1

Tabla 1. Centros de control del desarrollo de la extremidad y sus moléculas mediadoras en los tres ejes de formación.

Se puede decir que la formación de una extremidad está regulada básicamente por tres regiones o centros de control del desarrollo: **ZAP**, **AER** y **ZP** (FIG.3).

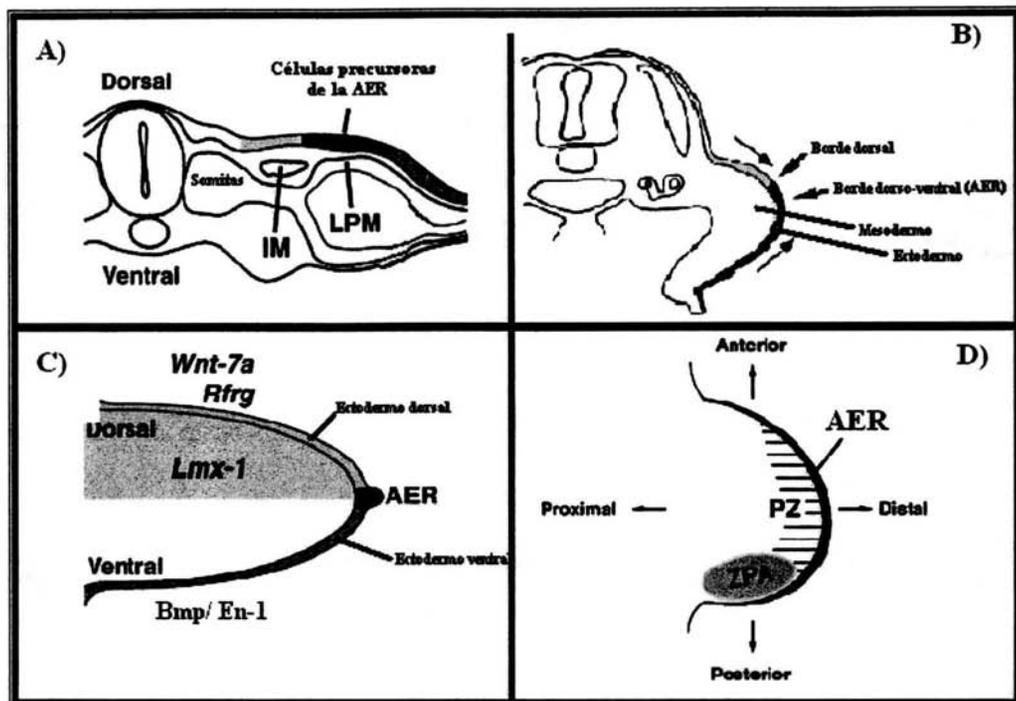


FIGURA 3. Formación del primordio de la extremidad y formación de la cresta apical ectodérmica. A) Vista transversal de un embrión con cada una de sus partes que formaran el primordio de la extremidad. Mesodermo intermedio (IM), Mesodermo de la placa lateral (LPM). B) Las células del mesodermo comienzan a crecer y las del ectodermo comienzan a migrar para cubrir esta capa, formando una yema. En el borde que divide el ectodermo dorso-ventral se forma la AER. C) Información dorso-ventral que da origen y mantiene la AER en el primordio. D) Principales centros de emisión de señales en el primordio, con respecto a los ejes del desarrollo. Zona de actividad polarizante (ZAP), Cresta apical ectodérmica (AER), Zona de progreso (PZ). (Tomado de Capdevila, Izpisua, 2001)

Mientras que la extremidad crece a lo largo del eje próximo-distal, la expresión de varios genes que contienen una caja homeótica (HoxA, HoxD) sigue un patrón secuencial bien definido. Estos genes presentan una marcada regulación espacio-tiempo-dosis durante el desarrollo formando así cada uno de los segmentos que componen la extremidad (Jonson y Tabin, 1997).

Desde el hombro o la pelvis hasta la punta de los dedos se podrán distinguir principalmente tres segmentos. El primer segmento es llamado estilópodo con un solo elemento esquelético (húmero o fémur). El segundo segmento: el zeugópodo esta compuesto por dos elementos esqueléticos (radio y cúbito ó tibia y peroné). Finalmente el último segmento, el autótopodo, contiene los elementos esqueléticos característicos de la mano o del pie (FIGURA 4).

El patrón de expresión de las proteínas HoxA y HoxD va cambiando durante el desarrollo de la extremidad, siendo necesaria la expresión de Hoxd 9 y Hoxd10 para la formación del estilópodo. Posteriormente, la presencia del gen Hoxd 9 en la región anterior y de todos los Hoxd (9-13) en la región posterior de la yema contribuyen a la formación del zeugópodo; finalmente, con la expresión de Hoxa 13 y Hoxd 13 en la región anterior y unión anteroposterior, de Hoxa 12, Hoxa 13 y Hoxd 10-12 en la región posterior de la yema se forma el autótopodo (FIG.4).

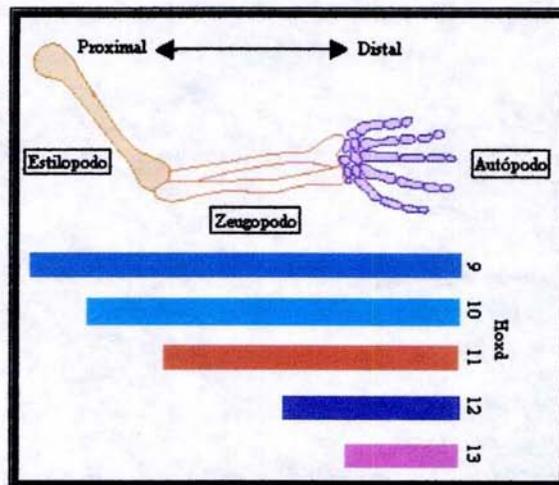


FIGURA 4. Niveles de Expresión de Hoxd en relación con los componentes esqueléticos de la extremidad. La información molecular del ratón se sobrepuso al esqueleto de la extremidad humana superior. (Tomado de Carlson, 2000)

Actualmente se sugiere que todos los segmentos que forman la extremidad ya están especificados desde los primeros estadios del desarrollo embrionario y que estos se irán expandiendo de manera progresiva junto con el crecimiento de la extremidad.

De esta forma, se piensa que las diferencias existentes entre un brazo o una pierna a nivel morfológico y funcional, están ya determinadas desde etapas muy tempranas, durante el inicio del desarrollo de la extremidad. Inclusive, algunos estudios realizados en ratones, pollos y peces zebra demostraron la expresión de genes específicos en el mesodermo de la placa lateral, como Tbx-5 (para la inducción de un miembro superior), y de Tbx-4 (para la inducción de un miembro inferior). De igual manera, otros genes como Hoxc4 y Hoxc5 se expresan únicamente en áreas en donde se formará la extremidad superior; mientras que el factor de transcripción Pitx-1 se expresa exclusivamente en la futura extremidad inferior (Capdevila, Izpisúa, 2001).

A medida que se forma la extremidad, la **AER** comienza a fragmentarse, quedando segmentos de epitelio engrosado solamente en las zonas que cubren los radios digitales. Esto promueve que los primordios de los dedos continúen creciendo, mientras que las células de los espacios interdigitales comienzan a morir.

La diferenciación y la histogénesis de los componentes tisulares específicos de la extremidad, son sucesos tardíos del desarrollo y se construyen con base en un plan morfogenético ya establecido (formación del esqueleto, músculos, nervios, y vascularización). En un inicio el mesénquima de la yema de la extremidad está formado únicamente por células provenientes del mesodermo de la placa lateral, estas células darán lugar al esqueleto, tejido conectivo y vasos sanguíneos.

Posteriormente las células provenientes de las somitas darán lugar a las células musculares. Otra población de células proveniente de la cresta neural, que también migrará hacia la yema de la extremidad, originará a las células de Schwann de los nervios y a los melanocitos (Carlson, 2000).

Aunque aún no se conoce cuál es el primer estímulo para el inicio del desarrollo de las extremidades, existen pruebas de que el factor 8 de crecimiento de fibroblastos (Fgf8) y el ácido retinoico son factores importantes en este proceso.

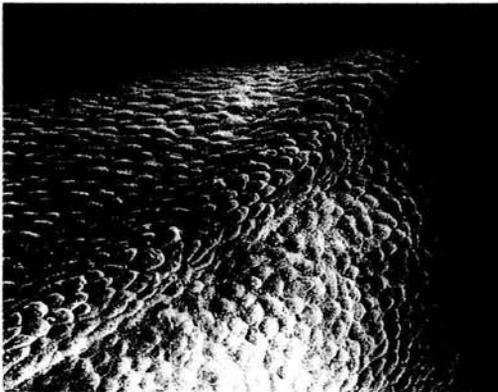
Con todo y los recientes avances científicos acerca de las bases moleculares de las interacciones que controlan el desarrollo de los miembros, existen aún preguntas sin responder: ¿Cómo se activa el comienzo del desarrollo de una extremidad y porque se forma en determinado lugar y tiempo específicos? ¿Qué es lo que determina la identidad de cada uno de los dedos? ¿Cómo se logra la especificación para la formación de un brazo o una pierna durante el desarrollo de la extremidad?

Es muy posible que, al responder estas preguntas se puedan comprender mejor los factores que causan las frecuentes y muy visibles anomalías de los miembros en humanos, muchas de ellas provocadas por trastornos en las interacciones celulares o moleculares específicas necesarias para el desarrollo de la extremidad.

2.2. LA CRESTA APICAL ECTODERMICA

La **AER**, como se mencionó anteriormente, es una formación epitelial de múltiples capas de ectodermo formada durante los estadios iniciales del desarrollo del primordio. Esta estructura se localiza entre los límites de las superficies dorsal y ventral de la parte distal de la extremidad en formación (FIG.5), y se caracteriza por la presencia de numerosas uniones comunicantes a través de las cuales las células se interconectan. La existencia de esta estructura es importante durante el crecimiento de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal, ya que se encarga de promover y controlar la proliferación y estado de indiferenciación de las células mesodérmicas que la subyacen en la llamada zona de progreso (**PZ**). De manera recíproca, la **AER** es mantenida por el mismo mesodermo que controla (Hinchliffe, 2002). Existe una lámina basal que se interpone entre la cresta apical ectodérmica y las células del mesodermo subyacente; parece ser que la integridad de esta capa de células es importante para la correcta interacción del mesodermo con el ectodermo en la yema del miembro durante su desarrollo.

a)



b)

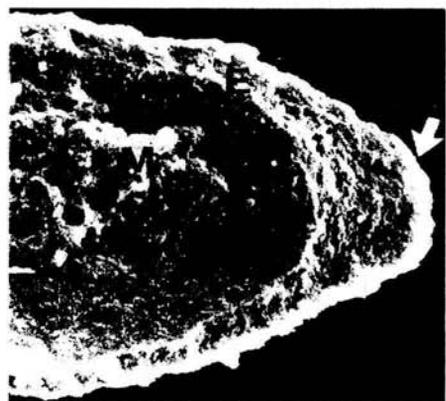


FIGURA 5. Estructura de la Cresta apical ectodérmica durante el día 29 de desarrollo de un embrión humano. a). Microfotografía electrónica de barrido de la cresta apical ectodérmica prominente sobre el borde apical de la yema de un miembro. b) Micrografía electrónica de barrido de un corte longitudinal del primordio. La flecha señala la AER. Ectodermo (E), mesodermo (M). (Tomada de Mariani y Martin, 2003; Larsen, 1998).

Desde 1984, para determinar la función de esta estructura se han realizado experimentos en modelos animales (pollos) a los cuales se les ha removido experimentalmente la **AER** durante diversas etapas de su desarrollo, observándose una detención en el desarrollo del miembro y anomalías esqueléticas, principalmente de la región distal (Saunders, 1984). Con esto se demuestra que la señalización de la **AER** es esencial para el desarrollo de los huesos en las extremidades. La presencia de una cresta apical ectodérmica adicional sobre la yema del miembro provoca la formación de un miembro supernumerario (Carlson, 2000).

Dentro de esta estructura se expresan muchos de los genes pertenecientes a las familias de FGF (Fgf-8, Fgf-2 y Fgf-4), Wnt y BMP. Los FGFs parecen ser importantes reguladores de la función de la **AER** al observarse que es posible inducir experimentalmente el desarrollo de una extremidad mediante la aplicación de FGFs en el flanco del embrión. La expresión de Wnt y Bmp se requiere durante la señalización celular, necesaria para el establecimiento y mantenimiento de esta estructura. (Mariani y Martin, 2003).

Aún no son totalmente conocidos los requerimientos para la inducción de la **AER**, pero se sabe que la expresión de Wnt-3a parece ser importante durante este proceso, al igual que FGF-8 que se expresa en el ectodermo lateral durante las primeras etapas de la formación del miembro y de la cresta apical ectodérmica.

2.3. EL GEN p63

En 1998 se identificó el gen p63 en el cromosoma 3q27-29 humano y en la región proximal del cromosoma 16 del ratón (Yang *et al.*, 1998). Este gen de más de 60 kb está constituido por 16 exones y pertenece, junto con p73, a la familia del gen supresor de tumores p53 debido a la homología dentro de los tres dominios funcionales que comparten estos dos genes con p53. Estos dominios son: el de transactivación NH₂ (TA), el de unión al ADN (DBD), y el de tetramerización terminal COOH (ISO) (FIG.6).

Debido a que los genes p73 y p63 tienen mayor homología entre sí que con p53, se piensa que estos dos primeros son evolutivamente más cercanos con respecto al último. Al parecer el gen p63 es el gen más antiguo y conservado dentro de la familia de p53, pues las comparaciones realizadas de este con posibles precursores de p53 en especies de invertebrados, como el calamar, demuestran una gran homología y conservación de secuencias (Yang y McKeon, 2000). A esto se le puede añadir la notable preservación de la secuencia primaria de aminoácidos en los genes p63 de ratón y humano al observarse únicamente 8 sustituciones dentro de los 483 aminoácidos de la proteína (99% de identidad) (Yang *et al.*, 1998).

P63 codifica para al menos seis diferentes proteínas de aproximadamente 448 aminoácidos cada una, que comparten un solo marco abierto de lectura. Estas isoformas son el resultado de dos sitios promotores y de diferentes tipos de *splicing*, algunas de estas pueden actuar como factores de transcripción de otros genes debido a que tienen un dominio de transactivación (TA), mientras que las isoformas que carecen de este dominio, tienen la capacidad de bloquear la habilidad de activación de la transcripción de este mismo gen como resultado de la competencia entre las distintas isoformas de la proteína (Yang *et al.*, 1998).

Las proteínas TA-p63 α , TA-p63 β , y TA-p63 γ son transcritas desde un promotor 5', mientras que las isoformas Δ N-p63 α , Δ N-p63 β y Δ N-p63 γ , que carecen del dominio de transactivación NH₂, se transcriben desde un promotor 3' localizado en el intron 3 del gen (Meredith y Kaelin, 2001) (FIG.6).

TA-p63 α contiene en su extremo C-terminal un dominio α -esteril (SAM), región que se encuentra también en otras proteínas encargadas de regular el desarrollo en mamíferos y que interviene de manera importante en las interacciones proteína-proteína con otros dominios SAM durante la homo u hetero-oligomerización (Thanos y Bowie, 1999; Ghioni *et al.*, 2002). Esta isoforma es incapaz de activar la transcripción, aún teniendo el dominio de transactivación, esto es por que en el extremo C-terminal α -específico de la proteína, justo después del dominio SAM, se encuentra un dominio inhibidor de la transcripción (TID) (van Bokhoven y Brunner, 2002). Además de estas seis isoformas existen otras tres más que conservan el dominio de transactivación, pero denominadas TA*p63- α , TA*p63 β y TA*p63- γ debido a que tienen una adición de 39 aminoácidos en el extremo NH₂ terminal de la proteína (Yang *et al.*, 1998) (FIG.6).

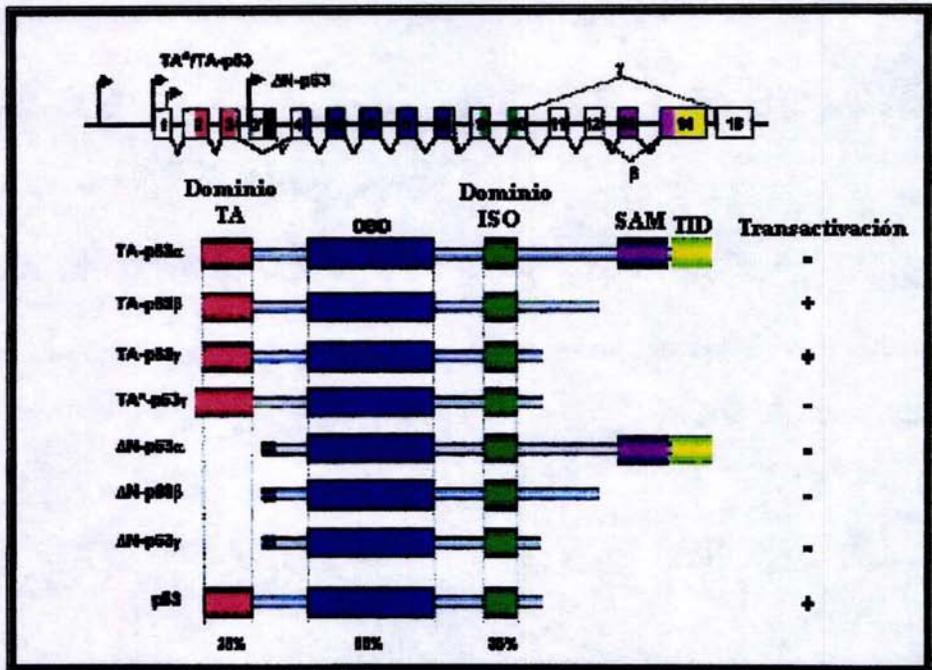


FIGURA 6. Estructura del gen p63 y de las isoformas de la proteína. (Tomado de van Bokhoven y Brunner, 2002)

La proteína contiene dominios ricos en prolina, implicados en la actividad pro-apoptótica y de activación de secuencias blanco. En algunas ocasiones actúa como factor de transcripción, activando promotores de genes que responden a p53 implicados en el control del ciclo celular, la reparación del ADN y apoptosis. Como por ejemplo p21, Bax, MDM2, GADD45, ciclinaG, IGFBP3 (Meredith y Kaelin, 2001). También se encuentra implicado en la activación de promotores de otros genes como loricina o involucrina, cuya expresión se incrementa durante la diferenciación de las células epidérmicas (De Laurenzi *et al.*, 2000).

Las isoformas ΔN de la proteína cumplen un papel antiapoptótico al impedir la transactivación de genes blanco de p53, mientras que las isoformas TA-p63, al contrario, inducen la apoptosis. Es por esto que se le ha dado a la proteína ΔN -p63 un posible papel en el desarrollo del cáncer en algunos tejidos epiteliales (Little y Jochemsen, 2002). ΔN -p63 α parece ser degradado cuando se causa un daño al ADN por radiación UV-B, mientras que las formas TA-p63 aumentan (Kato *et al.*, 2000; Liefer *et al.*, 2000). Sin embargo, las personas con alguna mutación heterocigota dentro de p63 no desarrollan ningún tumor y no se ha manifestado que este gen esté mutado en cánceres humanos (Michael y Oren, 2002). Aparentemente estos datos indican que p63 no es un gen supresor de tumores típico, pero sí un elemento importante en el desarrollo embrionario.

La inactivación homocigota del gen p63 en ratones puso de manifiesto su importancia como regulador clave en la morfogénesis craneofacial, epidérmica y de las extremidades, provocando su inactivación la muerte de los ratones poco después de su nacimiento. Los animales presentan extremidades truncadas y la piel carece de estratificación, además, no se expresan marcadores de diferenciación celular de la epidermis (K-1, K-10, filagrina, loricrina). Se debe mencionar también que los derivados epidérmicos como folículos capilares, dientes, glándulas mamarias y sudoríparas no se desarrollan (Mills *et al.*, 1999). En estos animales se pueden observar, junto con los cuadros severos de displasia ectodérmica, el maxilar y mandíbula truncados y el paladar secundario que no cierra (paladar hendido) (FIG.7). Todas estas características fenotípicas son muy similares a las existentes en individuos que presentan ciertos síndromes hereditarios de malformaciones congénitas de extremidades y defectos en estructuras derivadas del ectodermo, de los que se hablará mas adelante.

Algunas de las funciones que se le atribuyen al gen p63 son el establecimiento, diferenciación y posterior mantenimiento de la **AER**, la preservación del estado de proliferación en las células epidérmicas basales (Hyunsook y Kimelman, 2002) y una adecuada señalización ectodermo-mesénquima necesaria para la formación de estructuras como folículos pilosos, dientes, uñas, glándulas sudoríparas y glándulas mamarias (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

ΔN -p63 α , que es un blanco transcripcional directo de Bmp (Bakkers *et al.*, 2002), se expresa en células epiteliales y mantiene la proliferación de la epidermis mediante la inhibición de la transcripción de genes blanco de p53 (Hyunsook y Kimelman, 2002). Es importante mencionar que los niveles de TA-p63 son mayores durante la diferenciación de los queratinocitos (Meredith y Kaelin, 2001).

Estudios de hibridación *in situ* realizados en tejidos de pollo y de ratones demuestran que p63 se expresa de manera abundante en la **AER** del primordio de las extremidades, en los tejidos interdigitales, en el epitelio del arco branquial, y células basales del epitelio (Mills, 1999; Yasue *et al.*, 2001)

Es notable que las mutaciones encontradas en p63 presentes en individuos con el síndrome de Ectrodactilia-Displasia Ectodérmica-Labio/paladar Hendido (**EEC**) se encuentren localizadas en aminoácidos equivalentes a los mutados en p53 de varios tumores humanos (Walker *et al.*, 1999). Los defectos provocados por mutaciones dentro de este gen no parecen ser el resultado de una haploinsuficiencia, puesto que individuos con deleciones constitutivas de 3q27 no presentan alguna característica asociada a alguno de los síndromes anteriormente mencionados, además de que ratones con el gen p63 deletado de manera heterocigota tampoco presentan algún defecto aparente (Yang *et al.*, 1999).

Posiblemente este tipo de mutaciones tenga algún efecto complejo en la función de transactivación o de represión dentro de alguno de los 6 isotipos de la proteína, provocando un efecto dominante negativo, un cambio en la función, o incluso un efecto de ganancia de función (van Bokhoven *et al.*, 2001).

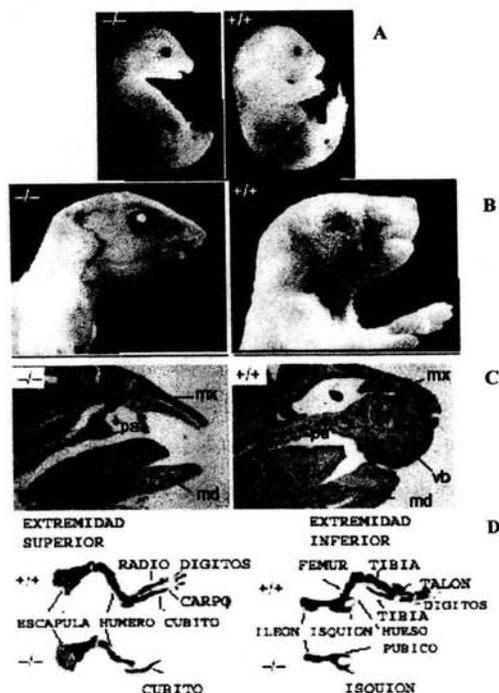


FIGURA 7. Fenotipo del ratón “knockout” para el gen p63. A) y B) Vista lateral de un ratón sin el gen p63^{-/-} (izquierda), y un ratón normal^{+/+} (derecha). A) Se observa la falta de desarrollo de las extremidades superiores e inferiores en el ratón^{-/-}. B) Desarrollo anormal de los maxilares, la ausencia de párpados, bigote, piel, y folículos pilosos en el ratón^{-/-}. C) Sección sagital de la región cráneo-facial. En el ratón^{-/-} se observan anomalías en el maxilar (mx), la mandíbula (md) y el paladar secundario (pa), además de ausencia de los primordios de los dientes (pd). D) Vista de los huesos que componen las extremidades superiores (izquierda) e inferiores (derecha). El mutante homocigoto^{-/-} pierde los componentes distales del miembro superior: el radio, el carpo y los dedos. De igual forma, pierde la mayoría de los componentes del miembro inferior. (Tomado de Yang *et al.*, 1999)

2.4. MALFORMACIONES EN EXTREMIDADES: LA ECTRODACTILIA

Durante el desarrollo esquelético embrionario se pueden originar alteraciones que provocan diversas anomalías de las extremidades (malformaciones congénitas), estas se presentan en 1 de cada 800 recién nacidos vivos. En el humano, un número significativo de estas malformaciones se origina por alteraciones en alguno de los genes o vías de señalización que intervienen en la formación de las extremidades.

Los estudios genéticos en modelos animales y en humanos han permitido la identificación de algunos genes responsables de anomalías en las extremidades, además de moléculas clave implicadas en el crecimiento y establecimiento de patrones del desarrollo en el primordio de la extremidad. Sin embargo, la complicada interconexión de señales genéticas hace difícil el establecimiento de una clara correlación genotipo-fenotipo. La variabilidad fenotípica dentro de las familias puede ser explicada por la acción de diferentes genes modificadores, factores como mosaicismo somático, inactivación del cromosoma X o la influencia de agentes no genéticos como el ambiente (Carlson, 2000; Larsen, 1998).

Una de las malformaciones congénitas de extremidades para la cuál se conoce el defecto genético que la provoca en algunos de sus casos es la ectrodactilia, debido a que se han detectado mutaciones en el gen *p63* en individuos que presentan este defecto (Ilanakiev *et al.*, 2000; van Bokhoven *et al.*, 2001).

La ectrodactilia (**SHFM** por su nombre en inglés: Split Hand split Foot Malformation) es una anomalía del desarrollo fetal que se caracteriza por la ausencia total o parcial de uno o más dedos de manos o pies, en la mayoría de los casos de los dedos 2 y 3. Este defecto se presenta aproximadamente en 1 de cada 18,000 recién nacidos y se encuentra asociada a otros defectos físicos en aproximadamente 40% de los casos (Czeizel *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1994).

Algunos casos de ectrodactilia se han asociado a aberraciones cromosómicas específicas dentro de las regiones 7q22.1, 6q16.3-q22.3, 2q24-q31, Xq24-q27 y 10q24-q25, lo que sugiere que estos loci contienen genes relacionados con esta malformación de las extremidades (Ianakiev *et al.*, 2000).

La ectrodactilia puede ocurrir de manera aislada o asociada a diversos síndromes autosómicos dominantes entre los que destacan el de Ectrodactilia-Displasia Ectodérmica-Labio/paladar Hendido (**EEC** por su nombre en inglés: *Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft-lip/palate*) (Celli *et al.*, 1999; Kosaki *et al.*, 2001; van Bokhoven *et al.*, 2001; Barrow *et al.*, 2002), el *Limb-Mammary Syndrome* (**LMS**) (van Bokhoven *et al.*, 2001), el síndrome *Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth* (**ADULT**) (Amiel *et al.*, 2001; Duijf *et al.*, 2002), y la ectrodactilia con displasia ectodérmica (**EE**). Otro síndrome relacionado es el de anquiloblefaron (fusión congénita de los párpados), displasia ectodérmica y labio hendido (**AEC**) (McGrath *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002).

El síndrome de Ectrodactilia-Displasia Ectodérmica-Labio/paladar hendido (**EEC**) generalmente presenta defectos de manos y pies, desde la sindactilia (fusión congénita de dos o más dedos entre sí) hasta ectrodactilia. En este síndrome de expresividad variable y penetrancia incompleta también se pueden observar alteraciones del desarrollo en uñas, dentición anormal, alteraciones oculares, estrabismo y anomalías en el tracto urinario (van Bokhoven *et al.*, 2001).

Recientemente se ha demostrado la existencia de mutaciones en el gen p63 en casos con los síndromes **EEC**, **AEC**, **ADULT**, **LMS**, **EE**, y en algunos casos de **SHFM** (Celli *et al.*, 1999). En este gen se han detectado hasta la fecha aproximadamente 42 tipos de mutaciones en 85 familias, 64% de las mutaciones corresponde a casos con el síndrome **EEC**; 13% a casos con

AEC, lo mismo que para la ectrodactilia aislada; mientras que los síndromes **ADULT**, **LMS** y **EE** cuentan cada uno con 3% de las mutaciones detectadas. De este modo, al menos 90% de los casos con **EEC** son resultado de mutaciones en p63 (De Mollerat *et al.*, 2003; van Bokhoven y Brunner., 2002).

El patrón de mutaciones encontradas a lo largo de la proteína en cada uno de los síndromes antes mencionados es diferente (correlación genotipo-fenotipo), indicando un patrón específico para cada enfermedad como consecuencia de diferentes alteraciones en la función de la proteína y no solamente a una pérdida de su función.

La mayoría de las mutaciones que originan el síndrome **EEC** ocurren en el dominio **DBD** de la proteína (Celli *et al.*, 1999; van Bokhoven *et al.*, 2001), mientras que las observadas en el síndrome **AEC** se localizan dentro del dominio α -esteril (**SAM**) (McGrath *et al.*, 2001) y los cambios en el marco de lectura en el extremo 3' causan **LMS** (van Bokhoven *et al.*, 2001). En contraste, se han detectado mutaciones en distintos sitios del gen en pacientes con **SHFM** (van Bokhoven *et al.*, 2001; Ianakiev *et al.*, 2000) (FIG.8).

Sin embargo, únicamente alrededor del 10% de los casos estudiados con ectrodactilia aislada (**SHFM**) son consecuencia de alguna mutación dentro del gen p63, y 4 de los 6 tipos de mutaciones encontradas hasta la fecha en sujetos con este defecto no han sido detectadas en ningún individuo con alguno los síndromes autosómicos dominantes que presentan ectrodactilia como una de sus manifestaciones.

Las mutaciones identificadas dentro del dominio **DBD** de p63 que causan **SHFM** parecen afectar aminoácidos que no están directamente implicados en la unión al ADN. Mientras que para el caso del síndrome **EEC**, los cambios ocurren en aminoácidos que interactúan directamente con el ADN (Ianakiev *et al.*, 2000) (FIG. 9).

Sin embargo, se han encontrado casos en donde existe una coincidencia de los sitios de mutación causantes de **EEC** ó **SHFM**, lo que indica la existencia de una variabilidad fenotípica bastante amplia dentro o entre las familias que presentan ectrodactilia, ya sea aislada o asociada a algún síndrome como **EEC** (FIG. 8).

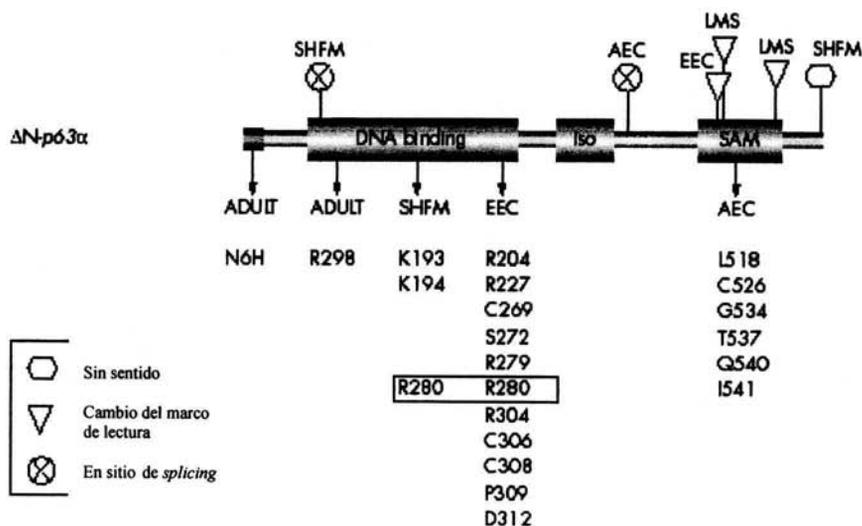


FIGURA 8. Distribución de mutaciones en p63. (Tomado de Brunner *et al.*, 2002)

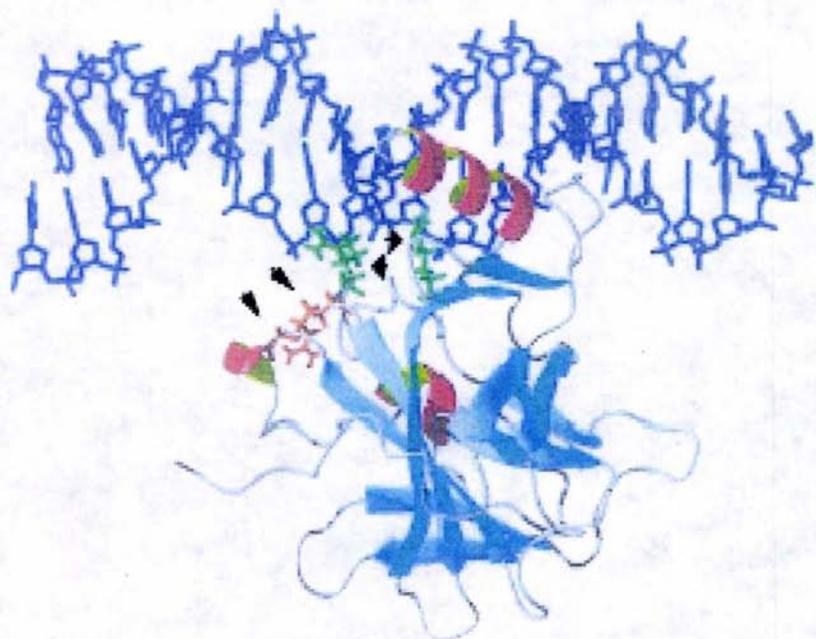


FIGURA 9. Diagrama del dominio DBD de p63, basado en la estructura de su proteína homóloga, p53. Las flechas alargadas indican los aminoácidos mutados en SHFM (rojo). Las flechas pequeñas indican algunos de los residuos mutados en EEC (verde). (Tomada de Ianakiev *et al.*, 2000)

3. OBJETIVO

Determinar la presencia, localización y tipo de mutaciones en el gen p63 en un grupo de sujetos mexicanos con ectrodactilia sindrómica o aislada.

4. JUSTIFICACIÓN

La caracterización del espectro mutacional del gen p63 en sujetos mexicanos con ectrodactilia contribuirá para una mejor comprensión de la relación genotipo-fenotipo y permitirá realizar inferencias acerca de la participación de los diferentes dominios de la proteína p63 en el origen de algunas malformaciones de extremidades.

5. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se seleccionaron 14 sujetos para el estudio, de los cuales 3 fueron diagnosticados con el síndrome EEC, 2 con síndrome EE y los 9 individuos restantes se diagnosticaron como casos de ectrodactilia aislada. (SHFM, SHM, ó SFM) (TABLA 2)

Todos los sujetos otorgaron su consentimiento escrito para participar en el estudio. En el caso de los menores de edad, el consentimiento lo otorgaron sus padres.

Los pacientes fueron reclutados de los servicios de genética del Hospital General de México y del Centro Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México.

TABLA 2. Características clínicas y diagnóstico de los sujetos incluidos en el estudio

Paciente	Genero	Defectos de las extremidades	Otros defectos	Diagnostico
1	Femenino	Ectrodactilia/sindactilia en manos/pies	Labio y paladar hendidos/displasia ectodérmica/anquiblefaron/ blefaritis	SX. EEC
2	Masculino	Ectrodactilia en manos	Labio hendido/displasia ectodérmica	SX. EEC
3	Masculino	Ectrodactilia/braquidactilia en manos	-----	SHM
4	Femenino	Ectrodactilia/sindactilia en manos	-----	SHM
5	Masculino	Ectrodactilia en manos	Hipospadias	SHM
6	Masculino	Ectrodactilia en manos	Dismorfismo facial	SHM
7	Masculino	Ectrodactilia en manos y pies	-----	SHFM
8	Femenino	Ectrodactilia en manos/sindactilia en pies	-----	SHM
9*	Femenino	Ectrodactilia en pies/segundo dedo de la mano izquierda hipoplasico/ braquidactilia en manos y pies	Displasia ectodérmica	SX. EE
10*	Femenino	Ectrodactilia en manos y pies	Labio/paladar hendido displasia ectodérmica	SX. EEC
11	Femenino	Ectrodactilia en manos y pies	Displasia ectodérmica obstrucción del tracto lacrimal	SX. EE
12	Femenino	Ectrodactilia en pies/pulgares hipoplasicos	-----	SFM
13	Femenino	Ectrodactilia en manos y pies	-----	SHFM
14	Masculino	Ectrodactilia en mano derecha	-----	SHM

EEC: ectrodactilia, displasia ectodérmica labio/paladar hendido; EE: ectrodactilia con displasia ectodérmica; SHFM: ectrodactilia aislada en manos/pies; SHM: ectrodactilia en manos; SFM: ectrodactilia en pies. Los pacientes 9* y 10* son madre e hija (caso familiar). Los pacientes marcados en oscuro son a los que se les encontró algún tipo de mutación en p63 en este estudio.

6. METODOLOGÍA

Con el consentimiento de cada uno de los 14 individuos incluidos en el estudio, o de sus padres, se extrajo una muestra de 2ml de sangre periférica, a partir de la cuál se extrajo el ADN genómico de los leucocitos utilizando el reactivo DNAzol BD (GIBCO), como se describe a continuación.

6.1. *EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA*

Se colocaron 500 µl de sangre total en un microtubo eppendorf de 2 ml con 1 ml del reactivo DNAzol BD y se agitó durante 30 segundos. Se agregaron 400 µl de alcohol isopropílico y se agitó la muestra durante 1 minuto. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después centrifugarla a 6000 rpm durante 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y al botón residual en el tubo se le añadieron 500 µl de DNAzol BD. Se agitó el tubo hasta disolver el botón. De nuevo, la muestra se centrifugó a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se le agregó al botón 1 ml de etanol al 75% y se agitó hasta disolver el botón. La muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, además, se retiró el exceso de alcohol con la ayuda de una micropipeta.

Finalmente, se agregaron al botón 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 8 mM y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente, para después transferir el NaOH con el ADN disuelto a un tubo eppendorf de 0.5 ml limpio. La muestra se guardó a -20°C hasta su utilización.

6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO

Se determinó la concentración y pureza del ADN extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Se verificó que las concentraciones de ADN obtenidas en cada una de las 14 muestras fueran suficientes para la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La lectura a 260 nm es la que se utilizó para calcular la concentración del ADN por medio de la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}](\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{la absorbancia a 260 nm} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

En donde 0.05 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) corresponde a una $D.O_{.260} = 50\mu\text{g}$ de ADN (doble cadena)/ml

Además, la relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica.

6.3. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *p63*

Se realizó la amplificación por PCR de los 16 exones y de las uniones exón/intrón del gen *p63* a partir del ADN de los 14 individuos con oligonucleótidos específicos para cada exón (adquiridos en la casa comercial ACCESOLAB) (TABLA 3). Cada reacción de amplificación de 25 μl contenía: buffer para PCR 1X, de 100 a 200 ng de ADN genómico, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 2.5 unidades de enzima TaqPolimerasa (INVITROGEN), 1mM del oligonucleótido correspondiente (en sentido y antisentido), y de 1 a 3 mM de MgCl_2 , dependiendo del exón a amplificar (TABLA 3). La mezcla se llevó a 25 μl con agua bidestilada.

Para la amplificación se utilizó un termociclador Applied Biosystems 9600, con un programa de temperaturas descrito a continuación: 1 ciclo de 3 min a 94°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización, 2 min de alineamiento con la temperatura específica para cada par de oligonucleótidos (TABLA 3), y 1 min a 72°C para la extensión. Por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final.

Oligonucleótidos y condiciones de PCR para el Análisis Mutacional de p63						
EXON	Secuencias de los Primers		Tamaño del producto de PCR (pb)	Condiciones		Concentración de MgCl ₂
	Sentido (5' - 3')	Antisentido (3' - 5')		Temperatura de Alineamiento (°C)		
1	TC CCG GCT TTA TAT CTA TAT ATA C	GAC ACA TTC ATA ATA CAC AAG GCA C	211	59		2.0
2	TCC ACT TGG GTT TTC ATG ATA GAG	GTA AGC AAT ATT TTG ACC ACC CAC	300	58		2.5
3	GCT TGT TGT TAA CAA CAG CAT G	GAA AAG ACA GGT TTA ACA GAG C	281	59		2.5
3'	CAT ATT GTA AGG GTC TCA GAG G	GAC CGA GAA CCG CAA ATA CG	223	59		1.0
4	GAT CCG TGG CTT CAG CGG	AAG CCC ATC CTT GGA CTT GG	354	58		2.5
5	GTT GGT TCT CTC CTT CCT TTC	GCC CAC AGA ATC TTG ACC TTC	291	57		3.0
6	CCA CCA ACA TCC TGT TCA TGC	GTT CTC TCA AGT CTA CTC AGT CC	267	55		2.5
7	GGG AAG AAC TGA GAA GGA ACA AC	CAG CCA CGA TTT CAC TTT GCC	253	55		2.5
8	GTA GAT CTT CAG GGG ACT TTC	CCA ACA TCA GGA GAA GGA TTC	260	54		2.5
9	GCT TTA GAA GTG TTC CCA GG	ACA CCT CCT TTC CCA TTG TC	237	55		2.5
10	TGA GGA TTG ACC ACA CTT CTA AC	CAT CAA TCA CCC TAT TGC TGA TC	287	61		2.0
11	TGA NCA TCA TTT CCA TGT TTG TC	TCA CAG AGT CTT GTC CTA AGC	254	57		3.0
12	GGA CTA TAA CAG TAT CCG CCC	CAA GAT GGA CGA CTG GGA TG	294	60		2.0
13	CTT ATC TCG CCA ATG CAG TTG G	AAC TAC AAG GCG GTT GTC ATC AG	240	55		2.5
14	GGG AAT GAT AGG ATG CTG TGG	AAG ATT AAG CAG GAG TGC TT	449	54		2.0
15	GAT GAA GTC CTA GGC CTT C	GGA AAT ACA ACA CAC ACA CT	205	55		1.0

TABLA 3. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para amplificar por PCR los 16 exones del gen p63.

6.4. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos obtenidos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tinción de bromuro de etidio (0.0002%) para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (FIG.10). Se observó el gel en un trans-iluminador de luz UV, se identificaron las bandas y se cortaron del gel para su purificación con el método de adhesión a perlas de vidrio (kit QIAEX II).

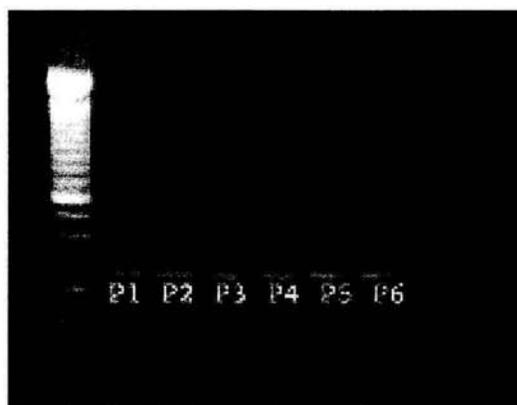


FIGURA 10. Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% con los productos obtenidos de la amplificación del exón 7 del gen p63 de seis pacientes (P1-P6). El producto obtenido fue de 253 pb. De izquierda a derecha, primer carril: marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2-7: productos amplificados de los pacientes.

6.5. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Los fragmentos de ADN amplificados contenidos en las bandas de gel cortadas se purificaron con ayuda del kit QIAEX II (QIAGEN) realizando el siguiente procedimiento:

Se colocó cada banda de agarosa en un tubo eppendorf de 2 ml, al cual se le añadieron 800 µl de amortiguador QX1, de 10-20 µl de resina QIAEX II y se mezcló con vortex.

La muestra se incubó a 50°C durante 10 minutos o hasta que la agarosa se disolvió por completo y después se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para posteriormente decantar el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de amortiguador QX1 y se mezcló hasta disolver por completo el botón. Nuevamente se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Al botón resultante se le adicionaron 500 µl de amortiguador PE (de alcoholes) y se mezcló en el vortex. La muestra se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se repitieron nuevamente los pasos 7 y 8 y al final se eliminaron cuidadosamente con micropipeta los residuos del amortiguador PE. A continuación se dejó secar el botón a 50°C, para después resuspenderlo con 20 µl de agua bidestilada. Finalmente, la muestra se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio de 0.5 ml.

La concentración del ADN amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa (DNA low mass ladder, GIBCO) al correr las muestras en un gel de agarosa al 1.2% (FIG.11).

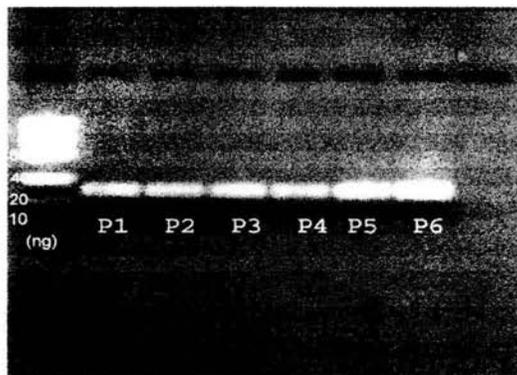


FIGURA 11. Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% para la cuantificación de los productos de amplificación por comparación de la intensidad de las bandas obtenidas de los pacientes 1 al 6 (P1-P6). En el primer carril de izquierda a derecha se ve el marcador estándar de masa, los carriles 2-7 tienen los productos de amplificación del exón 5 del gen p63. El tamaño de producto es de 291 pb.

6.6. SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se realizaron reacciones de PCR para la secuenciación automática nucleotídica de cada uno de los exones. Cada reacción de 20 μl contenía: 4 μl de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (APPLIED BIOSYSTEMS) que contiene los cuatro dideoxynucleótidos marcados por fluorescencia, desoxirribonucleótidos trifosfatados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl_2 y ampliTaQ polimerasa; además se agregaron 1 μl del oligonucleótido correspondiente 10 μM en sentido 5'-3', aproximadamente 10 ng del ADN de cada exón como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 μl . Para este PCR se utilizó un termociclador con un programa de 25 ciclos a 97°C por 30 segundos para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento, y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos se purificaron por medio de columnas Centri Sep (APPLIED BIOSYSTEMS) para eliminar el exceso de ddNTPs marcados por fluorescencia. Para ello se realizó la siguiente metodología:

Se hidrataron las columnas por un periodo mínimo de 2 horas con 800 μl de agua destilada y se centrifugaron a 3000 rpm por 3 minutos, posteriormente se retiró el exceso de agua. Las columnas fueron colocadas en tubos de 500 μl , para después colocar en el centro de la columna los 20 μl del producto de PCR de secuencia. Se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm.

Las muestras obtenidas en cada tubo receptor de 500 μl se desecaron en una centrifuga de vacío sin aplicar calor y cuidando de no secar en exceso. Cada muestra fue resuspendida en 25 μl de amortiguador de carga TSR (*Template Supresión Reagent*, de APPLIED BIOSYSTEMS) y posteriormente desnaturalizada en un termociclador con 5 minutos a 95°C.

Los productos fueron analizados en un secuenciador automático ABI Prism 310 (APPLIED BIOSYSTEMS) y las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas con las de los 16 exones del gen p63 isotipo TA-p63 α publicadas en la base de datos del GenBank (No. de acceso AF075430)

7. RESULTADOS

Por medio del análisis espectrofotométrico del ADN obtenido se verificó que todas las muestras tuvieran la concentración y calidad necesarias para su utilización en PCR. La relación 260/280 obtenida en todos los casos fue de entre 1.8 y 2, lo que indicó una pureza adecuada del ADN.

Todos los productos obtenidos de la amplificación por PCR de los 16 exones a partir del ADN genómico de cada individuo fueron del tamaño esperado, lo que descartó la presencia de rearrreglos génicos como duplicaciones o deleciones significativas en el gen estudiado.

A través de la secuenciación nucleotídica de toda la región codificante incluyendo las secuencias intrónicas que flanquean cada exón del gen p63 se identificaron 5 mutaciones heterocigotas puntuales en los exones 7, 5 y 3 del gen p63.

El caso número 1 y número 11, con diagnóstico de síndrome **EEC** y **EE** respectivamente, tuvieron un cambio de una base en el sitio **CGC**→ **CAC** en el exón número 7, lo que da una sustitución en el aminoácido 279 de la proteína: de una Arginina→ Histidina (**R279H**); esta mutación se localiza dentro del dominio conservado de unión al ADN de la proteína (FIGURAS 12 Y 13). Hay que mencionar que el caso 1 presenta además anquilobefaron, característica raramente encontrada en el síndrome **EEC** y típica del síndrome **AEC**.

Los casos 9 y 10 (FIG.14) fueron una paciente con fenotipo EE y su hija con el síndrome EEC. En estos dos casos se encontró una mutación puntual en el exón número 5: un cambio CGG→TGG en el codón 204 de p63 provocando la sustitución Arginina→ Triptofano (**R204W**). Esta mutación, como la anterior, también se localiza dentro del dominio **DBD** de la proteína.

La quinta mutación se encontró en el caso número 14 (FIG.15) con ectrodactilia unilateral (**SHM**) en mano derecha. El cambio fue en el exón 3 del gen, de CGC→TGC en el nucleótido 289. Con esto se produce una sustitución Arginina→ Cisteína en el aminoácido 97 (**R97C**) dentro del dominio **TA** de la proteína.

CGC → CAC → R279H

5' GAGGGGATAACCNCCGTCCAAT 3'

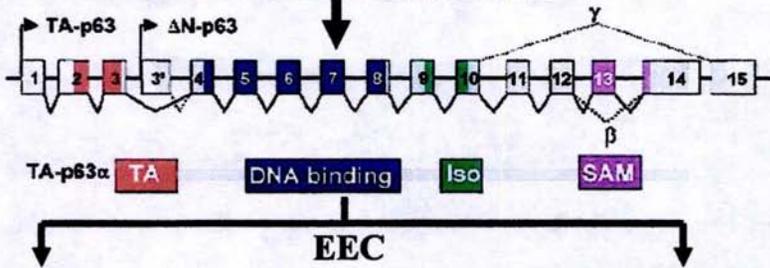
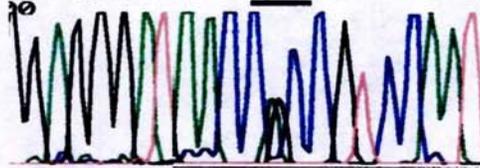


FIGURA 12. Mutación del gen p63 en el paciente número 1. En la parte superior se muestra la secuencia nucleotídica parcial del exón 7 que codifica parte del dominio de unión al ADN. La transición heterocigota G→ A cambia el codón de arginina (CGC) a uno de histidina (CAC). La mutación se denomina R279H. En la parte inferior se muestra el fenotipo de la paciente.

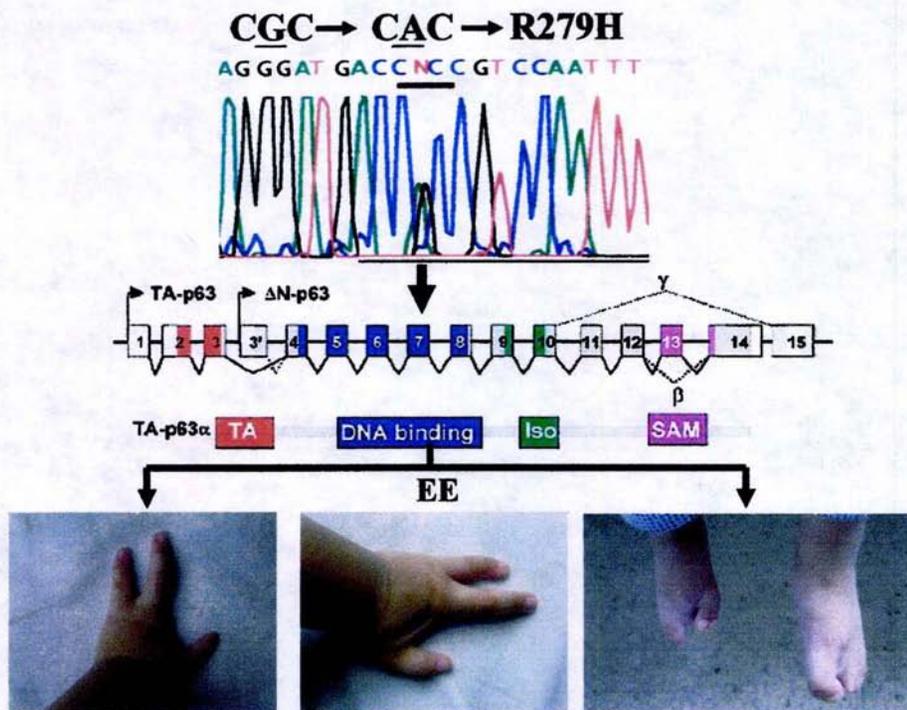


FIGURA 13. Mutación del gen p63 en el paciente número 11. En la parte superior se muestra la secuencia nucleotídica parcial del exón 7 que codifica parte del dominio de unión al ADN. La transición heterocigota G→ A cambia el codón de arginina (CGC) a uno de histidina (CAC). La mutación se denomina R279H. En la parte inferior se muestra el fenotipo del paciente.

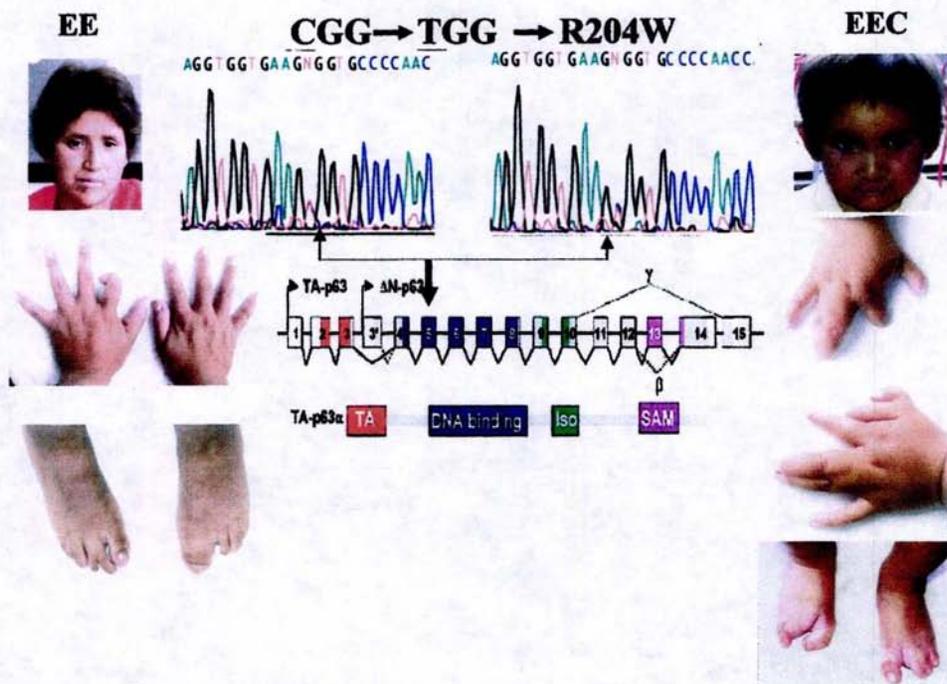


FIGURA 14. Mutaciones del gen p63 en las pacientes 9 y 10 (madre e hija). En la parte superior se muestran las secuencias nucleotídicas parciales del exón 5 que codifican parte del dominio de unión al ADN, portadoras de la transición heterocigota C→ T, que cambia el codón de arginina (CGG) por uno de triptofano (TGG). La mutación se denomina R204W. En los dos extremos laterales se muestran los fenotipos de las pacientes.

GGACT GTATCNGCAT GCAGGAC

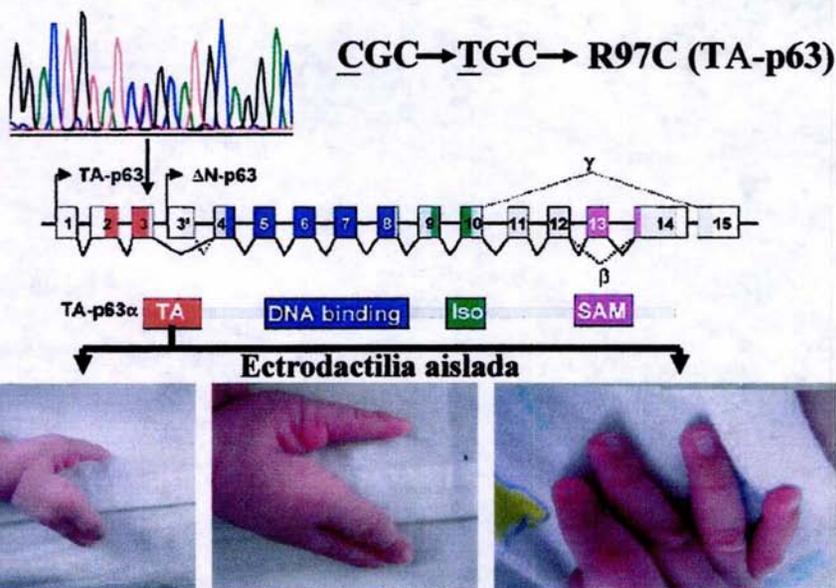


FIGURA 15. Mutación del gen p63 en el paciente 14. En la parte superior se muestra la secuencia nucleotídica parcial del exón 3 que codifica parte del dominio de transactivación de la proteína TA-p63, portadora de la transición heterocigota C → T, que cambia el codón de arginina (CGC) a uno de cisteína (TGC). Esta mutación denominada R97C no ha sido previamente descrita. En la parte inferior se muestra el fenotipo del paciente.

Todas las variaciones genéticas encontradas se confirmaron repitiendo la secuenciación con un templado nuevamente amplificado a partir del ADN genómico de cada individuo.

En el caso de la mutación **R97C** en el paciente 14 se realizó un análisis clínico de los padres, los cuáles no presentaron ningún defecto de piel o extremidades. Tampoco se encontró la mutación **R97C** en el ADN de la madre o del padre, lo que indica que la mutación en su hijo es *de novo*. Se analizó, además, el ADN de 75 individuos control, en los cuáles no se encontró esta mutación.

En los 8 casos restantes de ectrodactilia aislada no se encontraron cambios en ninguno de los 16 exones del gen, ni en alguna de las secuencias intrónicas que flanquean a estos.

Se localizó una deleción de una adenina en el intrón 5 localizado 4 nucleótidos río arriba del sitio de *splicing* del exón 6 de todos los casos estudiados. Se analizaron 50 individuos control y en todos se encontró esta deleción puntual, lo que confirmó que se trata de un polimorfismo muy frecuente en nuestra población.

8. DISCUSIÓN

El gen p63 cumple un papel importante durante el desarrollo temprano de las extremidades. Es un factor de transcripción esencial durante la señalización mesenquima-ectodermo para la formación de estructuras como folículos pilosos, dientes, uñas y glándulas sudoríparas o mamarias. Se expresa en las células basales de muchos tejidos epiteliales, y principalmente en la cresta apical ectodérmica (**AER**) de la yema de la extremidad, jugando un papel muy importante durante la diferenciación y posterior mantenimiento de esta estructura (Yang *et al.*, 1999).

En las células epidérmicas basales su función es la de conservar un continuo estado de proliferación, necesario para el mantenimiento y renovación de las células de las capas epiteliales (Hyunsook, y Kimelman, 2002).

Este es el primer análisis mutacional del gen p63 realizado en sujetos mexicanos con ectrodactilia aislada o sindrómica (Berdón-Zapata *et al.*, 2004). Todas las mutaciones descritas hasta la fecha para casos con el síndrome **EEC** han sido cambios en aminoácidos localizados dentro del dominio **DBD** de p63, afectando a todas las isoformas de la proteína, muchos de estos residuos corresponden a los mismos mutados en p53 en varios tumores humanos (R204, R279, R280 y R304) (Ghioni *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos confirman que la mutación **R279H** (casos 1 y 11) es la más común de las mutaciones encontradas, constituyendo el 13% (11 / 86) de todas las mutaciones descritas hasta la fecha en este gen, incluyendo nuestros resultados. El 17% de todas las mutaciones (15 / 86) afectan el aminoácido 279 dentro del dominio de unión al ADN de la proteína (**DBD**).

En este estudio el caso número 1 además de presentar características típicas del síndrome **EEC** presentó anquiloblefaron, característica del síndrome **AEC**. Este solapamiento de caracteres fenotípicos contradice la marcada correlación genotipo-fenotipo propuesta recientemente (Brunner *et al.*, 2002) que establece un patrón y tipo de mutaciones generalmente distinto para cada enfermedad.

En estudios realizados con individuos que presentan el síndrome **EEC** se ha podido observar una gran variabilidad inter e intra-familiar, lo que sugiere la existencia de genes que podrían actuar como posibles modificadores de p63 (Barrow *et al.*, 2002; van Bokhoven, y Brunner, 2002). Tal es el caso para los individuos 9 y 10 de este estudio, madre e hija, que teniendo la misma mutación (**R204W**) presentan notables diferencias fenotípicas. La hija presenta todos los defectos

característicos del síndrome **EEC**, mientras que la madre presenta ectrodactilia en pies, el segundo dedo de la mano izquierda hipoplásico, braquidactilia en manos y pies y displasia ectodérmica.

La complicada interconexión de señales genéticas en las extremidades en formación, además de la existencia de 6 isotipos con diferentes propiedades (represión o transactivación) de la proteína P63 hace difícil el establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo de forma estricta.

El gen p63 se encuentra mutado de manera heterocigota en aproximadamente 90% de los casos con **EEC**, siendo la mayoría sustituciones de aminoácidos dentro del dominio de unión al ADN que afectan a todas las isoformas de la proteína. Las mutaciones **R279H** y **R204W** encontradas en este trabajo en 4 de los de los individuos, son cambios descritos anteriormente en otros trabajos (Celli *et al.*, 1999, vanBokhoven *et al.*, 2001, Ianakiev *et al.*, 2000), lo que indica que estos codones, junto con el 227, 280 y el 304 son los que más frecuentemente se encuentran mutados en casos de **EEC**; todos estos codones están localizados en la región que codifica el dominio **DBD** de la proteína.

El dominio **DBD** cuenta con 4 regiones conservadas evolutivamente importantes para el plegamiento de la proteína y la creación de la superficie de unión al ADN, lo que lleva a pensar que las mutaciones dentro de este dominio, sustituyen los aminoácidos que interactúan directamente con el ADN o provocan un mal plegamiento de la proteína afectando su unión al ADN (Celli *et al.*, 1999). Únicamente los cambios en estos 5 codones son responsables del 75% de todos los casos descritos de **EEC** (Brunner *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que el caso número 2 no presentó ningún tipo de mutación dentro del gen p63, resultado que no se esperaba, puesto este individuo presenta características fenotípicas clásicas del síndrome EEC. Este dato indica que un subgrupo de pacientes con el síndrome EEC puede ser originado por mutaciones en un gen distinto a p63.

Las mutaciones descritas hasta la fecha en tres tipos de poblaciones humanas (Asiática, Caucásica y ahora la Hispana) presentan un patrón de mutaciones homogéneo, poniendo en evidencia nucleótidos altamente mutables dentro del gen p63. Los nucleótidos 727, 728, 797, 952, 953, 955 y el 1028 están alterados en aproximadamente 47% de todas las mutaciones encontradas en p63 y muchas de ellas son transiciones citosina → timina. Este patrón de mutaciones puede deberse a que la mayoría de los nucleótidos mutados están localizados en sitios CpG (van Bokhoven *et al.*, 2001), que son puntos calientes para mutaciones debido a la alta tasa de mutación de la 5-metilcitosina junto con una reparación deficiente de estos sitios (Rideout *et al.*, 1990; Tornaletti, y Pfeifer, 1994). Otra explicación podría ser que estas mutaciones tan recurrentes reflejen un mecanismo patogénico específico aún desconocido.

La mutación encontrada en el caso número 14 (**R97C**) es la primera descrita dentro del dominio **TA** en el extremo amino de la proteína P63, región altamente conservada que le da a la proteína la capacidad de activar la transcripción de algunos genes que responden a p53 e implicados en el control del ciclo celular, la reparación del ADN, apoptosis y diferenciación epidérmica (p21, Bax, MDM2, GADD45, ciclinaG, IGFBP3, loricina, involucrina) (Meredith, y Kaelin, 2001; De Laurenzi *et al.*, 2000).

El análisis molecular de los padres del paciente con esta mutación demostró que ninguno de ellos presenta el cambio, por lo que se concluye que la mutación se originó *de novo*.

El cambio Arginina→ Cisteína en el aminoácido 97 da como resultado la sustitución de un aminoácido básico por uno neutro, lo que puede causar algún cambio importante en la conformación de la proteína, y con esto la posible modificación de su función de transactivación.

El residuo Arginina 97 se encuentra conservado en p63 de ratón, mientras que este aminoácido cambia por Alanina en el gen p53 (Yang *et al.*, 1998), lo cual sugiere que este aminoácido puede conferirle una especificidad funcional a p63.

Nuestros resultados indican que la ectrodactilia aislada puede ser causada no sólo por mutaciones en el dominio de unión al DNA (**DBD**), sino también por mutaciones dentro del dominio canónico de transactivación (**TA**) de p63, sugiriendo fuertemente que la integridad de este dominio es importante para el desarrollo correcto de las extremidades. Con el hallazgo de la mutación **R97C** extiende el espectro de las anomalías moleculares encontradas en enfermedades asociadas a p63, pero se requieren estudios funcionales para determinar las consecuencias de esta nueva mutación en la actividad transcripcional de la proteína.

En 8 de los 9 casos con ectrodactilia aislada no se encontró ningún tipo de mutación en alguno de los 16 exones analizados o en las secuencias intrónicas que los flanquean, lo cuál confirma la baja frecuencia de mutaciones en p63 en los casos con la forma aislada de esta malformación. Únicamente en alrededor del 10% de los sujetos con **SHFM** se han identificado mutaciones en este gen (van Bokhoven *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002; de Mollerat *et al.*, 2003). La ectrodactilia aislada es una malformación con heterogeneidad genética, esto quiere decir que defectos en diferentes genes pueden ser la causa de este fenotipo.

Finalmente, se identificó un polimorfismo en el intrón 5 localizado 4 nucleótidos río arriba del sitio de *splicing* del exón 6, que consiste en la delección de una adenina (IVS5-4A-del). Nuestros resultados indican que esta alteración genética se trata de un polimorfismo común dentro de la población mexicana y que no se asocia a alguna consecuencia fenotípica.

Debido a su estructura genética, es difícil determinar con exactitud las repercusiones que tienen las mutaciones encontradas dentro de cada uno de los dominios que constituyen a p63, al dar como resultado distintas alteraciones en la función de transactivación o de represión de los más de 6 isotipos de esta proteína. Además, se tendría que establecer la interacción entre los isotipos mutados y silvestres para tratar de predecir el fenotipo resultante.

Se requieren de más estudios para comprender la función específica de cada una de las isoformas de esta proteína, así como de sus patrones de expresión durante el desarrollo de las extremidades y derivados ectodérmicos en el embrión. El conocimiento integral de los factores genéticos que rigen el desarrollo normal y anormal de las extremidades en humanos nos llevará a proponer nuevas estrategias para el implemento de medidas preventivas, acercamientos para la intervención terapéutica, además de generar nuevos conocimientos en el campo de la medicina molecular y la embriología.

9. CONCLUSIONES

- Las mutaciones encontradas en el gen p63 fueron de tipo puntual y heterocigotas; la mayor parte de estas (cuatro de cinco) ya había sido reportada en estudios previos realizados en otras poblaciones.
- Se encontró una mutación *de novo*, la primera descrita dentro del dominio TA en el extremo amino de TA-p63 (exón 3 del gen). Esta mutación (**R97C**) origina un caso de ectrodactilia aislada.
- Se pudo observar una gran variabilidad fenotípica intra e interfamiliar resultante de una misma mutación en p63.
- Existe una homogeneidad en las mutaciones de p63 dentro de diferentes poblaciones humanas estudiadas (Asiática, Caucásica e Hispana).
- La mayoría de los casos con ectrodactilia aislada no se asocia a mutaciones en p63.
- Se encontró un polimorfismo dentro del intrón 5 localizado 4 nucleótidos río arriba del sitio de splicing del exón 6 que consiste en la delección de una adenina (IVS5-4A-del). Este polimorfismo es común en la población mexicana y no ha sido descrito en otras poblaciones.

9.1. COMENTARIOS

- Se requieren estudios funcionales para determinar las consecuencias de la mutación en el dominio TA de la proteína.
- Se requiere el análisis de grupos más amplios de pacientes para confirmar o descartar la incipiente correlación genotipo-fenotipo en los síndromes genéticos asociados a mutaciones en p63.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AMIEL J., BOUGEARD G., FRANCCANNET C., RACLIN V., MUNNICH A., LYONNET S., FREBOURG T., 2001. *TP63 gene mutation in ADULT syndrome*. **Eur. J. Hum. Genet.**, **9**: 642-645.
- AHLBERG P. E., MILNER A. R., 1994. *The origin and early diversification of tetrapods*. **Nature**, **368**: 507-518.
- AHLBERG P. E., 1995. *Elginerpeton panchei and the earliest tetrapod clade*. **Nature**, **373**: 420-425.
- BAKKERS J., HILD M., KRAMER C., FURUTANI-SEIKI M., HAMMERSCHMIDT M., 2002. *Zebrafish $\Delta Np63$ is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm*. **Dev. Cell**, **2**: 617-627.
- BARROW L. L., VAN BOKHOVEN H., DAACK-HIRSCH S., ANDERSEN T., VAN BEERSUM S. E. C., GORLIN R., MURRAY J. C., 2002. *Analysis of the p63 gene in the classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts*. **J. Med. Genet.**, **39**: 559-566.
- BARROW J. R., THOMAS K.R., BOUSSADIA-ZAHUI O., MOORE R., KEMLER R., CAPECCHI M. R., MCMAHON A. P., 2002. *Ectodermal Wnt3/ β -catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge*. **Genes and Development**, **17**: 394-409.
- BERDÓN-ZAPATA V., GRANILLO-ÁLVAREZ M., VALDÉS-FLORES M., GARCÍA-ORTIZ J. E., KOFMAN-ALFARO S., ZENTENO J. C., 2004. *p63 gene analysis in Mexican patients with syndromic and non-syndromic ectrodactyly*. **J. Orthop. Res.**, **22**: 1-5.

- BRUNNER H. G., HAMEL B. C. J., van BOKHOVEN H., 2002. *The p63 gene in EEC and other syndromes. J. Med. Genet., 39: 377-381.*
- CARLSON B M., *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, 2ª ed., Harcourt S. A., Madrid, España, 2000; p.p. 189-213.
- CAPDEVILA J., IZPISÚA BELMONTE J. C., 2001. *Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 17: 87-132.*
- CELLI J., DUIJF P., HAMEL B. C. J., BAMSHAD M., KRAMER B., ARIE P. T. SMITS, RUTH NEWBURY-ECOB, RAOUL C. M. HENNEKAM, GRIET VAN BUGGENHOUT, ARIE VAN HAERINGEN, C. GEOFFREY WOODS, ANTHONIE J. VAN ESSEN, ROB DE WAAL, GERT VRIEND, DANIEL A. HABER, ANNIE YANG, FRANK MCKEON, HAN G. BRUNNER, HANS VAN BOKHOVEN, 1999. *Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. Cell, 99: 143-153.*
- CZEIZEL A. E., VITÉZ M., KODAJ I., LENZ W., 1993. *An epidemiological study of isolated split hand/foot in Hungary, 1975-1984. J. Med. Genet., 30: 593-596.*
- De LAURENZI V., ROSSI A., TERRINONI A., BARCAROLI D., LEVRERO M., COSTANZO A., KNIGHT R. A., GUERRIERI P., MELINO G., 2000. *p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 273: 342-346.*
- De MOLLERAT X J., EVERMAN D. B., MORGAN C. T., CLARKSON K. B., ROGERS R. C., R S COLBY, AYLSWORTH A. S., GRAHAM JR J. M., STEVENSON R. E., SCHWARTZ C. E., 2003. *P63 mutations are not a major cause of non-syndromic split hand/foot malformation. J. Med. Genet., 40: 55-61.*

- DUIJF P. H. G., VANMOLKOT K. R. J., PROPPING P., FRIED W., KRIEGER E., McKEON F., DÖTSCH V., BRUNNER H. G., van BOKHOVEN H., 2002. *Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63*. **Hum. Molec. Genet.**, **11**: 799-804.
- EVANS J. A., VITÉZ M., CZEIZEL A. E., 1994. *Congenital abnormalities associated with limb deficiency defects: a population study based on cases from the Hungarian congenital malformation registry (1975-1984)*. **Am. J. Med. Genet.**, **49**: 52-66.
- FREEMAN S., HERRON J. C., *Evolutionary Analysis*, 2^a ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, E. U. A., 2001; p.p. 459-462.
- GHIONI P., BOLOGNESE F., DUIJF P. H. G., van BOKHOVEN H., MANTOVANI R., GUERRINI L., 2002. *Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains*. **Molec. and Cel. Biol.**, **22**: 8659-8668.
- HINCHLIFE J. R., 2002. *Developmental basis of limb evolution*. **Int. J. Dev. Biol.**, **46**: 835-845.
- HYUNSOOK L., KIMELMAN D., 2002. *A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish*. **Dev. Cell**, **2**: 607-616.
- IANAKIEV P., KILPATRICK M. W., TOUDJARSKA I., BASEL D., BEIGHTON P., TSIPOURAS P., 2000. *Split-Hand/Split-Foot Malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27*. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 59-66.
- JOHNSON R. L., TABIN C. J., 1997. *Molecular models for vertebrate limb development*. **Cell**, **90**: 979-990.

- KATO I., AISAKI K. I., KURATA S. I., IKAWA S., IKAWA Y., 2000. *p51A (TAp63gamma), a p53 homolog, accumulates in response to DNA damage for cell regulation. Oncogene, 19: 3126–3130.*

- KAWAKAMI Y., CAPDEVILA J., BÜSCHER D., ITOH T., RODRIGUEZ ESTEBAN C., IZPISÚA BELMONTE J. C., 2001. *WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. Cell., 104: 891-900.*

- KOSAKI R., OHASHI H., YOSHIHASHI H., SUZUKI T., KOSAKI K., 2001. *A de novo mutation (R279C) in the P63 gene in a patient with EEC syndrome. Clin. Genet., 60: 314-315.*

- LARSEN W. J., *Essentials Of Human Embryology*, Livingstone, New York, E. U. A., 1998; p.p 207-228.

- LIEFER K. M., KOSTER M. I., WANG X. J., YANG A., MCKEON F., ROOP D. R., 2000. *Down-regulation of p63 is required for Epidermal UV-B-induced apoptosis. Cancer Res., 60: 4016-4020.*

- LITTLE N A., JOCHEMSEN A G., 2002. *Molecules in focus P63. Int. J. Biochem. Cell Biol., 34: 6–9.*

- MAHMOOD R., BRESNICK J., HORNBRUCH A., MAHONY C., MORTON N., COLQUHOUN K., MARTIN P., LUMSDEN A., DICKSON C., MASON I., 1995. *A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. Curr. Biol., 5: 797-806.*

- MARIANI F. V., MARTIN G. R., 2003. *Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. Nature, 423: 319-325.*

- McGRATH J. A., DUIJF P. H. G., DOETSCH V., IRVINE A. D., de WAAL R., VANMOLKOT K. R. J., WESSAGOWIT V., KELLY A., ATHERTON D. J., GRIFFITHS W. A. D., ORLOW S. J., VAN HAERINGEN A., AUSEMS M. G. E. M., YANG A., McKEON F., BAMSHAD M. A., BRUNNER H. G., HAMEL B. C. J., VAN BOKHOVEN H., 2001. *Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63*. **Hum. Mol. Genet.**, **10**: 221-229.
- MEREDITH S. I., KAELIN W. G., 2001. *p53 Family update: p73 and p63 develop their own identities*. **Cell Growth and Differentiation**, **12**: 337-349.
- MICHAEL D., OREN M., 2002. *The p53 and Mdm2 families in cancer*. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **12**:53-59.
- MILLS A. A., BINHAI Z., XIAO-JING W., HANNES V., ROOP D. R., BRADLEY A., 1999. *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. **Nature**, **398**: 708-713.
- MOON A. M., CAPECCHI M. R., 2000. *Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs*. **Nat. Genet.**, **26**: 455-459.
- RIDEOUT W. M., COETZEE G. A., OLUMI A. F., JONESP. A., 1990. *5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes*. **Science**, **249**: 1288-1290.
- SAUNDERS J. W., 1984. *The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm*. **J. Exp. Zool.**, **108**: 363-403.
- SORDINO P., van der HOEVEN F., DUBOULE D., 1995. *Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits*. **Nature**, **375**: 678-681.

- THANOS C. D., BOWIE J. U., 1999. *p53 family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins*. **Protein Sci.**, **8**: 1708–1710.
- TORNALETTI S., PFEIFER G. P., 1994. *Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer*. **Science**, **263**: 1436-1438.
- van BOKHOVEN H., HAMEL B. C. J., BAMSHAD M., SANGIORGI E., GURRIERI F., DUIJF P. H. G., VANMOLKOT K. R. J., VAN BEUSEKOM E., VAN BEERSUM S. E. C., CELLI J., MERKX G. F. M., TENCONI R., FRYNS J. P., VERLOES A., NEWBURY-ECOB R. A., RAAS-ROTSCHILD A., MAJEWSKI F., BEEMER F. A., JANECKE A., CHITAYAT D., CRISPONI G., KAYSERILI H., YATES J. R. W., NERI G., BRUNNER H. G., 2001. *p63 Gene mutations in EEC syndrome, Limb-Mammary syndrome, and isolated Split Hand-Split Foot Malformation suggest a genotype-phenotype correlation*. **Am. J. Hum. Genet.**, **69**: 481-492.
- van BOKHOVEN H., BRUNNER H. G., 2002, *Splitting p63*. **Am. J. Hum. Genet.**, **71**: 1-13.
- WALKER D. R., BOND J., TARONE R. E., HARRIS C., MAKALOWSKI W., BOGUSKI M., GREENBLATT M., 1999. *Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features*. **Oncogen**, **9**: 211-219.
- YANG A., MOURAD K., WANG Y., GILLET E., FLEMING M. D., DÖTSCH V., ANDREWS N. C., CAPUT D., McKEON F., 1998. *p63, a p53 Homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. **Molec. Cell**, **2**: 305-316.
- YANG A., SCHWEITZER R., SUN D., KAGHAD M., WALKER N., 1999. *p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development*. **Nature**, **398**: 714-718.

- YANG A., McKEON F., 2000. *P63 and P73: P53 mimics, menaces and more.* **Nature Reviews, Molec. Cell Biol.**, **1**: 199-207.

- YASUE A., TAO H., NAHNO T., MARIYAMA K., NAJI S., OHUCHI H., 2001. *Cloning and expression of the chick P63 gene.* **Mech. Dev.**, **100**: 105-108.

11. ANEXO I. ARTÍCULO PUBLICADO



p63 gene analysis in Mexican patients with syndromic and non-syndromic ectrodactyly

V. Berdón-Zapata^a, M. Granillo-Álvarez^a, M. Valdés-Flores^b,
J.E. García-Ortiz^c, S. Kofman-Alfaro^a, J.C. Zenteno^{a,*}

^a Department of Genetics, Facultad de Medicina-UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, CP 06726, Mexico City, Mexico

^b Department of Genetics, Centro Nacional de Rehabilitación, Mexico City, 14389 Mexico

^c Department of Molecular Immunobiology, Centro de Investigación Biomédica, Facultad De Medicina, UdeC, Torreón, Coahuila, Mexico

Received 15 January 2003; accepted 8 July 2003

Abstract

Ectrodactyly is a congenital limb malformation that involves a central reduction defect of the hands and/or feet which is frequently associated with other phenotypic abnormalities. The condition appears to be genetically heterogeneous and recently it has been demonstrated that mutations in the *p63* gene, a homologue of the tumor suppressor gene *p53*, are the cause of at least four autosomal dominant genetic syndromes which feature ectrodactyly: ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and facial clefting (EEC), split hand/split foot malformation (SHFM), limb-mammary syndrome (LMS), and acro-dermato-ungual-lacrimal-tooth syndrome (ADULT). In this study, genetic analysis of the *p63* gene in a group of 13 patients with ectrodactyly (syndromic and isolated) was performed. Four patients with syndromic ectrodactyly had *p63* heterozygous point mutations that affect the DNA binding domain of the protein. One of these subjects exhibited the typical features of EEC syndrome as well as ankyloblepharon being, to our knowledge, the first case combining these traits. This finding supports the view of a clinical overlap in this group of autosomal dominant syndromes caused by *p63* mutations and demonstrates that there are exceptions in the previously established *p63* genotype-phenotype correlation.

© 2003 Orthopaedic Research Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ectrodactyly; *p63* gene; EEC syndrome; Limb malformation

Introduction

Ectrodactyly or split hand-split foot malformation (SHFM) is a congenital defect of the distal limbs occurring in approximately 1 in 18,000 newborns [7]. It is characterized by varying degrees of central longitudinal fissuring and central ray deficiency frequently associated to syndactyly, and aplasia and/or hypoplasia of the phalanges, metacarpals, and metatarsals. Ectrodactyly is associated with other physical anomalies in up to 40% of the cases [5,7]. Syndromic ectrodactyly includes autosomal dominant entities like EEC syndrome which is defined by ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip with or without cleft palate [14], limb-mammary-syndrome (LMS) which associates ectrodactyly with

mammary gland defects as aplasia or hypoplasia of the mammary gland and nipple [18], and ADULT syndrome which displays acro-dermato-ungual-lacrimal-tooth defects [13]. These syndromes [1,2,4,6,9,16,19], as well as isolated SHFM [8,19] have been shown to result from mutations in the *p63* gene, a homologue of the archetypal tumor suppressor *p53*. In addition, mutations in *p63* have been found in patients with AEC syndrome, characterized by ankyloblepharon (congenital fusion of the eyelids), ectodermal dysplasia, orofacial clefting, but minimal to absent limb involvement [11].

To date, approximately 40 different *p63* gene mutations have been described in individuals with these five different entities (reviewed in [20]) and interestingly, the distribution of mutations over the various *p63* protein domains and the structural and functional implications of these mutations have revealed a striking genotype-phenotype correlation as the pattern of mutations is distinct for each of these syndromes [3,11,19].

* Corresponding author. Tel./fax: +52-55-10-35-06-12.

E-mail address: skofman@servidor.unam.mx (J.C. Zenteno).

This report presents the results of *p63* gene molecular analysis in a group of 13 Mexican patients with syndromic and isolated ectrodactyly.

Subjects and methods

Thirteen Mexican patients with syndromic or isolated ectrodactyly were included in the study. Three of them had a diagnosis of EEC syndrome, two had ectrodactyly and ectodermal dysplasia but no clefting (EE phenotype); the remaining eight subjects had isolated ectrodactyly. Patients #9 and #10 were mother and daughter. The detailed clinical description of each patient is shown in Table 1. After approval of the Institutional Review Board and given patient's informed consent, DNA was extracted from peripheral blood leukocytes in all subjects according to standard procedures. PCR amplification of the 16 exons of the *p63* gene was achieved using 16 pairs of primers previously described [19]. Each 25 μ l PCR amplification reaction contained 1X buffer, 100–200 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1U Taq polymerase, 1 mM of forward and reverse primers, and MgCl₂ between 1 and 3 mM. Temperatures program was identical as reported elsewhere [19]. PCR products were analyzed in 1.5% agarose gels from which the bands with the amplified templates were excised and the DNA subsequently purified with the help of the Qiaex II (Qiagen) kit. Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) adding ~10 ng of template DNA in each reaction and using a temperature program which included 25 cycles of denaturation at 97 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 15 s, and extension at 60 °C for 4 min. All samples were analyzed in an ABI Prism 310 (Applied Biosystems) Genetic Analyzer. Sequence variations were confirmed in each case using a newly amplified fragment.

Results

In all cases, the PCR amplified products were of the expected size excluding gross rearrangements at the *p63* locus. After sequencing the entire coding sequence and

the intron/exon junctions of the *p63* gene, four heterozygous mutations were identified in our group of Mexican patients with syndromic or isolated ectrodactyly. In patient 1, which had a diagnosis of EEC syndrome, a CGC to CAC mutation in exon 7 predicted an arginine to histidine change at position 279 of the p63 protein (R279H) which is located in the DNA binding domain of p63 (Fig. 1); it is important to emphasize that this patient had in addition ankyloblepharon (AEEC phenotype), which is an unusual finding in EEC. In patients 9 and 10 (a mother with EE phenotype and her daughter with EEC syndrome), a change from CGG to TGG at codon 204 in *p63* exon 5 predicted a shift from arginine to tryptophan (R204W), also situated in the DNA binding domain of the protein (Fig. 2); the third mutation was identified in patient 11 and was identical to that described in patient 1 (R279H); this patient exhibited a phenotype characterized by ectrodactyly associated to ectodermal dysplasia without facial clefting (EE phenotype). In addition, a previously undescribed intronic *P63* polymorphism was identified: in intron five, at position -4 of the acceptor splice site of exon 6, a deletion of an adenine was observed (IVS5-4A-del). This variant was observed in DNA from both control subjects and patients.

Discussion

Epithelial–mesenchymal interactions are essential for many aspects of vertebrate limb development. During the early stages of development, the limb bud mesenchyme induces the overlying distal tip ectoderm to

Table 1
Clinical features of patients included in the study

Patient #	Gender	Limb defects	Additional features	Diagnosis
1	Female	Ectrodactyly/syndactyly hands and feet	Cleft lip and palate/ectodermal dysplasia/ankyloblepharon/blepharitis	EEC
2	Male	Ectrodactyly in hands	Cleft lip/ectodermal dysplasia	EEC
3	Male	Ectrodactyly/brachydactyly in hands	...	SHM
4	Female	Ectrodactyly/syndactyly in hands	...	SHM
5	Male	Ectrodactyly in hands	Hypospadias	SHM
6	Male	Ectrodactyly in hands	Facial dysmorphism	SHM
7	Male	Ectrodactyly in hands and feet	...	SHFM
8	Female	Ectrodactyly in hands/syndactyly in feet	...	SHM
9*	Female	Ectrodactyly in feet/hypoplastic left hand second finger/brachydactyly in hands and feet	Ectodermal dysplasia	EE
10*	Female	Ectrodactyly in hands and feet	Cleft lip and palate/ectodermal dysplasia	EEC
11	Female	Ectrodactyly in hands and feet	Ectodermal dysplasia/lacrimal duct obstruction	EE
12	Female	Ectrodactyly in feet/hypoplastic thumbs	...	SFM
13	Female	Ectrodactyly in hands and feet	...	SHFM

EEC = ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and facial clefting; EE = ectrodactyly and ectodermal dysplasia; SHFM = split hand–split foot malformation; SHM = split hand malformation; SFM = split foot malformation.

* Patients #9 and #10 were mother and daughter.

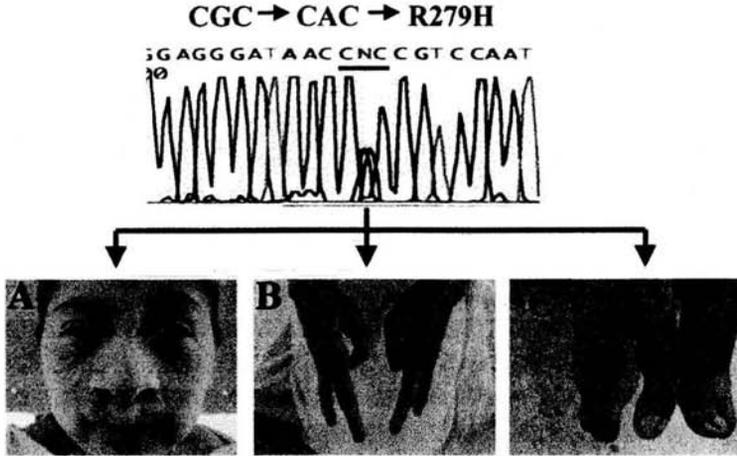


Fig. 1. Upper panel: p63 exon 7 nucleotide sequencing in patient 1 demonstrates a heterozygous G to A substitution that converts an arginine residue (CGC) to a histidine (CAC), designated R279H. Lower panel: phenotypic features of patient 1. (A) Repaired bilateral cleft lip and right chronic blepharitis. (B) Bilateral ectrodactyly of the hands and nail dysplasia. (C) Bilateral ectrodactyly of the feet.

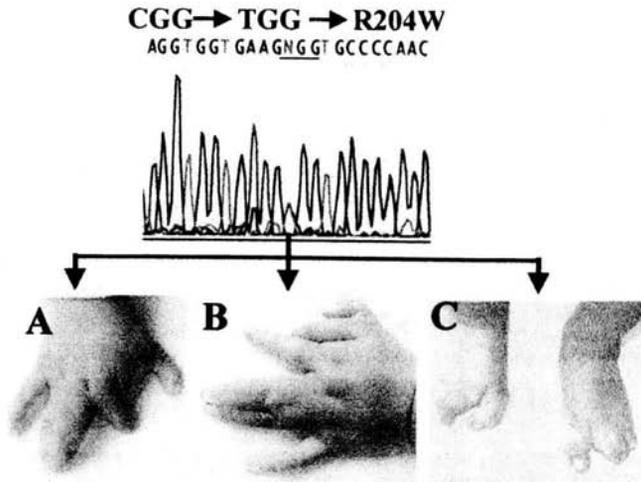


Fig. 2. Upper panel: p63 exon 5 nucleotide sequencing in patient 10 demonstrates a heterozygous C to T substitution that converts an arginine residue (CGG) to tryptophan (TGG), designated R204W. Lower panel: limb features of patient 10. (A) Right hand showing ectrodactyly and thumb hypoplasia. (B) Left hand showing polydactyly, syndactyly between the third and fourth digits, and hypoplastic thumb. (C) Bilateral ectrodactyly of the feet.

thicken and form a morphologically distinct structure known as the apical ectodermal ridge (AER). Subsequent interactions between the AER and the underlying mesenchyme are responsible for proliferation, patterning and outgrowth of the developing limb. The AER is required for proliferation of the mesenchyme along the

proximodistal axis of the limb and the maintenance of the antero-posterior patterning center in the posterior mesenchyme, the zone of polarizing activity. Similarly, the mesenchyme is required for the maintenance of the AER (reviewed in [16,17]). Therefore, proper signaling along the antero-posterior axis between the AER and

the underlying mesoderm is crucial for normal formation of the distal limb. Recent evidence indicates that a number of factors direct ridge-mesenchyme interactions, including members of the fibroblast growth factor family (FGFs) and sonic hedgehog (SHH) [10].

p63, a gene homolog to the cell cycle regulator *p53*, is an essential transcription factor also involved in the mesenchymal-ectodermal signaling of the AER. The *p63* gene is expressed in the progenitor cells of many epithelial tissues, particularly in the limb bud AER, branchial arches, and the epidermal appendages [21,22]. Mice knockout for *p63* display a severe phenotype with absence of most of the tissues that are derived from these progenitor cells and newborn mice usually die due to dehydration shortly after birth [12,22]. These mutant animals exhibit a severe phenotype characterized by limb truncations, craniofacial abnormalities, lack of the epidermal components and defects in structures dependant on epidermal-mesenchymal interactions such as hair follicles, teeth primordia, and mammary glands [12,22].

Ectrodactyly is a distal limb malformation that can occur isolatedly or as part of complex genetic malformation syndromes [15]. Recently, it has been demonstrated that *p63* is a major locus for syndromic (EEC, LMS, and ADULT syndromes) or isolated (SHFM) autosomal dominant ectrodactyly [3]. In addition, AEC syndrome which is characterized by ankyloblepharon, ectodermal dysplasia, orofacial clefting and minimal to absent limb defects has been associated to mutations in the SAM domain of *p63* [11].

Our study confirms that the mutation R279H is the most common *p63* disease-causing mutation as it accounts for 13% (11 out 84, including our results) of all pathogenic *p63* mutations described so far. In fact, approximately 18% of *p63* mutations (15 out 84) affect amino acid number 279, located within the DNA binding domain of the protein. However, combined mutational data indicate extensive genotype-phenotype correlation with each of the above mentioned syndromes having a distinct pattern and type of *p63* mutations.

It is interesting to note that in the 3 population in which *p63* mutations have been described to date (Caucasic, Asiatic, and Hispanic, in this study), a *p63* mutational homogeneity is evident. These observations indicate that there are *p63* nucleotides highly mutable as those in positions 727, 728, 797, 952, 953, 955, and 1028, which accounts for approximately 47% of all *p63* mutations. This remarkable mutational pattern may be explained by the fact that all these nucleotides are located at CpG sites [19], which are mutational hotspots. Another possibility is that this mutational profile is caused by a specific pathogenetic gain of function-mechanism, as was previously suggested [19].

An interesting finding in this study was the antecedent of ankyloblepharon in patient 1, which exhibited the

typical features of EEC syndrome (ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and facial clefts). Ankyloblepharon is not considered part of EEC syndrome but is a cardinal feature in AEC syndrome which associates ankyloblepharon, severe ectodermal dysplasia, and facial clefting with minimal or absent limb anomalies. To our knowledge this is the first case in which a mutation in *p63* is associated with an EEC syndrome phenotype in addition to ankyloblepharon. This finding supports the view of a clinical overlap in this group of autosomal dominant syndromes caused by *p63* mutations and is in opposition to the strict genotype-phenotype correlation previously observed in *p63*-related human syndromes [19].

Cases 9 and 10 (mother and daughter) carried a R204W mutation that affects the DNA-binding domain of *p63*. However, the phenotypic expression of this alteration was significantly different in both patients as the mother exhibited incomplete ectrodactyly in feet, minimal hand involvement, ectodermal dysplasia and no facial clefts, while the daughter showed a severe phenotype characterized by bilateral cleft lip and palate, ectodermal dysplasia and complete ectrodactyly in hands and feet (Fig. 2). This striking intrafamilial phenotypic difference associated with a particular *p63* mutation could be attributed to the involvement of additional genetic factors (modifier genes), as previously suggested [20]. Finally, given that *p63* is essential for early limb development, it would be interesting to investigate the potential role of this gene in the etiology of other autosomal dominant limb malformations and thus identify new members of the expanding *p63* mutation family of human malformation syndromes.

In conclusion, our results are in agreement with previous reports in which *p63* mutations are frequently associated to EEC or EEC-like disorders but are uncommon in isolated SHFM. *p63* mutations in Mexican patients with syndromic ectrodactyly correspond to those found in other populations reflecting a mutational homogeneity in this gene. In addition, we identify a *p63* mutation which is associated with an EEC syndrome phenotype as well as ankyloblepharon, which to our knowledge is a non-previously described association. This case illustrates that there are exceptions in the uniform genotype-phenotype correlation observed in the group of *p63* related disorders.

References

- [1] Amiel J, Bougeard G, Francannet C, Raclin V, Munnich A, Lyonnet S, et al. TP63 gene mutation in ADULT syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001;9:642-5.
- [2] Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SEC, Gorlin R, et al. Analysis of the *p63* gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet* 2002;39:559-66.

- [3] Brunner HG, Hamel BCJ, van Bokhoven H. The p63 gene in EEC and other syndromes. *J Med Genet* 2002;39:377-81.
- [4] Celli J, Duijf P, Hamel BCJ, Bamshad M, Kramer B, Smits APT, et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999;99:143-53.
- [5] Czeizel AE, Vitéz M, Kodaj I, Lenz W. An epidemiological study of isolated split hand/foot in Hungary, 1975-1984. *J Med Genet* 1993;30:593-6.
- [6] Duijf PHG, Vanmolkot KRJ, Propping P, Friedl W, Krieger E, McKeon F, et al. Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. *Hum Mol Genet* 2002;11:799-804.
- [7] Evans JA, Vitez M, Czeizel A. Congenital abnormalities associated with limb deficiency defects: a population study based on cases from the Hungarian Congenital Malformation Registry (1975-1984). *Am J Med Genet* 1994;49:52-66.
- [8] Ianakiev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet* 2000;67:59-66.
- [9] Kosaki R, Ohashi H, Yoshihashi H, Suzuki T, Kosaki K. A de novo mutation (R279C) in the P63 gene in a patient with EEC syndrome. *Clin Genet* 2001;60:314-5.
- [10] Kuhlman J, Niswander L. Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development* 1997;124:133-9.
- [11] McGrath JA, Duijf PHG, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KRJ, et al. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet* 2001;10:221-9.
- [12] Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398:708-13.
- [13] Propping P, Friedl W, Wienker TF, Uhlhaas S, Zerres K. ADULT syndrome allelic to limb mammary syndrome (LMS)? *Am J Med Genet* 2000;90:183-4.
- [14] Roelfsema NM, Cobben JM. The EEC syndrome: literature study. *Clin Dysmorphol* 1996;5:115-27.
- [15] Sifakis S, Basel D, Ianakiev P, Kilpatrick MW, Tsipouras P. Distal limb malformations: underlying mechanisms and clinical associations. *Clin Genet* 2001;60:165-72.
- [16] Tabin CJ. Retinoids homeoboxes, and growth factors: toward molecular models for limb development. *Cell* 1991;66:199-217.
- [17] Tickle C, Eichele G. Vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:121-52.
- [18] van Bokhoven H, Jung M, Smits AP, van Beersum S, Ruschendorf F, van Steensel M, et al. Limb mammary syndrome: a new genetic disorder with mammary hypoplasia, ectrodactyly, and other hand/foot anomalies maps to human chromosome 3q27. *Am J Hum Genet* 1999;64:538-46.
- [19] van Bokhoven H, Hamel BCJ, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PHG, et al. p63 gene mutations in EEC syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2001;69:481-92.
- [20] Van Bokhoven H, Brunner HG. Splitting p63. *Am J Hum Genet* 2002;71:1-13.
- [21] Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillette E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63 a p53 homolog at 3q27-29 encodes multiple products with transactivating death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-16.
- [22] Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker M, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, cranio-facial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714-8.