



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de los genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* en pacientes con displasia ectodérmica hipohidrótica.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
José David Abad Flores

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM

COTUTORA  
Dra. Nancy Monroy Jaramillo  
Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso  
Departamento de Genética, Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Marisol López López  
Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad de México. Julio, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## ***Agradecimientos***

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), cuya ayuda, hizo posible presentar los avances del proyecto en la Conferencia Europea de Genética Humana 2015, Glasgow, Escocia, Reino Unido.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
Historia	4
Diagnóstico clínico de la displasia ectodérmica hipohidrótica	5
Manejo y pronóstico de la displasia ectodérmica hipohidrótica	6
Bases moleculares de la displasia ectodérmica hipohidrótica	8
EDA	8
EDAR	10
EDARADD	10
Vía de señalización de la ectodisplasina	12
De EDA a la vía NF-kB	12
WNT10A	15
Inactivación del cromosoma X y DEH ligada al X	16
<b>Justificación</b>	<b>19</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>21</b>
<b>Sujetos y métodos</b>	<b>22</b>
Procedimiento para toma de muestra y extracción de DNA genómico	22
Análisis cuantitativo y cualitativo de DNA	24
Análisis por MLPA para detección de variaciones en el número de copia (CNV)	24
MLPA ( <i>Multiplex Ligation –Dependent Probe Amplification</i> )	26
Detección del sesgo en la inactivación del cromosoma X	31
Secuenciación	35
Reacción de PCR	35
<b>Resultados</b>	<b>41</b>
Resultados moleculares	43

<b><i>Discusión</i></b>	<b>56</b>
<b><i>Conclusiones</i></b>	<b>70</b>
<b><i>Referencias</i></b>	<b>71</b>

## Resumen

**Introducción.** La displasia ectodérmica hipohidrótica (DEH) es una enfermedad que tiene una frecuencia de 1:10,000-1:100,000 recién nacidos vivos. Se caracteriza por hipotricosis, anodoncia e hipohidrosis. Generalmente presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X y en algunas familias una herencia autosómica dominante o recesiva. Se han identificado 4 genes causantes: *EDA* (Xq12-q13.1), *EDAR* (2q13), *EDARADD* (1q42.2-q43) y *WNT10A* (2q35), además el polimorfismo rs3827760 (T>C) del exón 12 de *EDAR* se asocia con presencia de cabello delgado y dientes “en pala” en asiáticos y amerindios. **Objetivo:** Determinar la frecuencia y el tipo de mutaciones en los genes implicados en DEH y relacionarlo con el fenotipo. **Sujetos y métodos.** Previo consentimiento informado, se evaluaron clínicamente a pacientes con DEH de los cuales se obtuvo el DNA genómico de sangre periférica. Se analizaron los cuatro genes mencionados por la técnica de amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA de MRC-Holland® panel P183-C1) para determinar variaciones en el número de copias. Se realizó secuenciación para identificar variaciones de los genes *EDA*, *EDAR* y *EDARADD*. Se analizó el patrón de inactivación del cromosoma X en una familia. **Resultados y discusión.** Se estudiaron 18 pacientes de 17 familias. En 13 pacientes masculinos pertenecientes a 12 familias se encontraron mutaciones en *EDA* (12/17; 70.58%). Solo una de ellas fue de dosis y corresponde a una delección del exón 1 que se confirmó en la madre, quien tenía pocos datos clínicos y en la abuela materna del paciente quien presentaba mayor afección. En dos hermanos, uno con trisomía 21, se identificó por secuenciación una mutación en el exón 8 de *EDA*: c.1038G>C, p.C346W. En tres pacientes no relacionados se encontró la mutación rs132630312 c.463C>T p.R155C, lo que indica una frecuencia alta de este cambio en nuestros casos, así como en dos pacientes se encontró una mutación de sentido equivocado en el residuo 156 (rs132630314 y rs13260313). Estas tres mutaciones abolen el proceso proteolítico de EDA. Adicionalmente se identificaron dos mutaciones no reportadas (p.G29fs\*69; p.N372K) en dos pacientes diferentes y otras tres previamente reportadas (p.R357W, p.H54R y p.Q306H). Se identificaron 13 portadoras por análisis molecular y una obligada por árbol genealógico. Se observó un patrón de inactivación del X sesgado en las dos portadoras estudiadas, madre y abuela del paciente con delección del exón 1 de *EDA*. Solo en un paciente masculino se identificó una mutación *de novo* en *EDAR* en el exón 12, c.1193-1194del TT (1/17; 5.88%), que genera un codón de paro en el codón 398, no descrita previamente. En relación al polimorfismo rs3827760 (T>C) del exón 12 de *EDAR*, 10/18 pacientes fueron homocigotos CC, 7 CT y sólo uno fue homocigoto para el alelo común. En tres pacientes masculinos y uno femenino (4/17; 23.52%) no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados. Todos los pacientes presentaban la triada característica

de la enfermedad. Los resultados moleculares permitieron dar asesoramiento genético, incluyendo la identificación de portadoras con o sin datos clínicos de la enfermedad. Este estudio confirma que la forma ligada al X de DEH tiene una prevalencia alta en nuestra población, y que en algunos casos muestra penetrancia incompleta en las mujeres portadoras de la mutación, probablemente asociada al proceso de inactivación del cromosoma X.

## Introducción

Las displasias ectodérmicas (DE) son un conjunto de enfermedades poco frecuentes que resultan de un desarrollo anormal o deficiente de los tejidos derivados del ectodermo durante el desarrollo embrionario. Las DE se asocian con defectos en la piel, cabello y dientes, condiciones graves que afectan la calidad de vida de los pacientes.

El ectodermo es una de las tres capas germinales que se forman durante la embriogénesis y es crucial para la formación de las glándulas sudoríparas, cabello, uñas y esmalte de los dientes. A pesar de que las DE no son alteraciones comunes, se han reportado al menos 150 tipos de defectos congénitos que afectan estructuras del ectodermo y sus apéndices y que se dividen en 11 subgrupos clínicos (Sepúlveda W et al., 2003). Dentro de este amplio grupo de alteraciones congénitas, la displasia ectodérmica hipohidrótica (DEH) es la forma más común con una incidencia de 1/10,000 a 1/100,000 recién nacidos vivos (Clarke A et al., 1987; Jones KL et al., 1997).

La DEH se caracteriza clínicamente por: hipohidrosis, hipotricosis y oligo/anodoncia. Las manifestaciones clínicas de la DEH también incluyen resequedad en la piel, ojos, vías aéreas y membranas mucosas, esto es debido a defectos en el desarrollo de las glándulas exocrinas. La DEH también se asocia con características dismórficas como frente abultada, ojeras, nariz plana, labios prominentes y ocasionalmente la ausencia de pezones (Cluzeau C et al., 2010).

La mayoría de los casos de DEH tienen un patrón de herencia recesivo ligado al X, sin embargo, también se han descrito patrones de herencia autosómico dominante y autosómico recesivo (Sepúlveda W et al., 2003). La gravedad del cuadro clínico de la DEH varía entre los diferentes pacientes, además esta enfermedad puede ocasionar problemas sociales y psicológicos relevantes, así como una gran carga económica para las familias afectadas (Norderyd J, 2012).

La forma más frecuente de DEH (MIM #305100) es ocasionada por mutaciones en el gen *EDA* que se localiza en la región cromosómica Xq12-13.1 y codifica para la proteína ectodisplasina (MIM #300451), un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Bayes M et al., 1998; Kere J et al., 1996). Las mutaciones en el gen que codifica para el receptor de EDA (*EDAR*) localizado en 2q11-q13 (MIM #604095), o en el gen que codifica para el dominio de muerte asociado a EDAR (*EDARADD*), ubicado en el cromosoma 1q42-q43 (MIM #606603), se han identificado como causa de DEH con patrones de herencia tanto

autosómico dominante como autosómico recesivo (Bal E et al., 2007; Headon DJ et al., 2001; Monreal AW et al., 1999). Estas tres formas de DEH son clínicamente indistinguibles probablemente porque alteran la misma vía de señalización causando el mismo efecto fenotípico.

Se ha demostrado que las mutaciones con pérdida de función en el gen *WNT10A*, (cromosoma 2q35, MIM #257980) ocasionan la displasia ónico-odonto dérmica, una forma poco común de displasia ectodérmica (Adaimy L et al., 2007; Nawaz S et al., 2009). Otros investigadores han documentado mutaciones en *WNT10A* en tres pacientes con problemas de sudoración (Bohring A et al., 2009; Nagy N et al., 2010; van Geel M et al., 2010). Se han descrito 270 mutaciones diferentes en *EDA*, 56 en *EDAR* y solamente 8 en *EDARADD* como causa de DEH (Sadier A et al., 2014, HGMDDB).

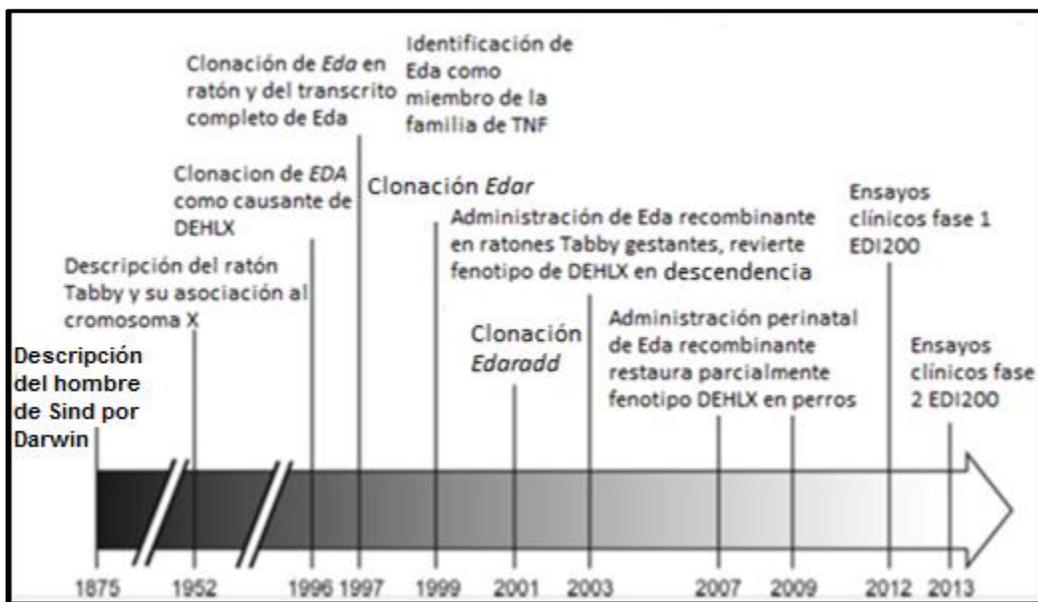
## Historia

En 1848 Thurnam reportó tres casos de DEH en pacientes relacionados, incluyendo a dos primos varones y la descripción de la abuela materna como portadora de un síndrome hereditario caracterizado por cabello escaso, ausencia de dientes y piel seca (Thurnam J., 1848). La DEH fue la condición que también presentaban “los hombres sin dientes de Sind,” miembros de una familia hindú que residían en la localidad de Hyderabad, quienes fueron descritos por Darwin y más tarde por Thandani KI (Thandani KI., 1934).

En 1875, Darwin escribió lo siguiente: “Puedo dar un caso análogo que me ha comunicado el señor W. Wedderburn de una familia hindú en Sind, en la cual diez hombres a lo largo de cuatro generaciones fueron dotados en ambas mandíbulas con solo cuatro dientes incisivos débiles y con ocho molares posteriores. Estos hombres afectados tienen poco vello corporal y se vuelven calvos a edad temprana. También sufren durante períodos de calor de resequedad extrema de la piel. Es notable que no se ha reportado ninguna hija afectada... aunque las hijas de la familia mencionada transmiten la característica a sus hijos y no se ha reportado ningún caso de transmisión padre-hijo, por lo tanto la afección solo aparece en generaciones alternantes o después de largos intervalos.” Fue hasta 1935 que Hutt FB prestó atención a la descripción hecha por Darwin (Figura 1) (Lefebvre S et al., 2014).

En 1963 Graves describió un numeroso grupo del sur de Mississippi, EUA afectado por esta alteración. Este grupo también fue descrito por la guía de administración del progreso de trabajos de Mississippi (WPA por sus siglas en inglés). Estos individuos tenían “glándulas sudoríparas subnormales” y en consecuencia en climas calurosos debían estar cerca de una alberca o arroyo donde pudieran sumergirse, frecuentemente llevaban consigo bandejas de

agua al campo para humedecer su ropa y refrescar sus cabezas, tenían pocos dientes, tal vez dos o tres en la parte superior y muy pocos en la parte inferior y eran finos y puntiagudos, su cabello era fino y sedoso pero corto y escaso, estas peculiaridades parecían ser heredadas solo a los varones, mientras que las mujeres no estaban afectadas (Graves R., 1963).



**Figura 1.** Línea del tiempo que resalta los principales descubrimientos en la investigación de *EDA*. (Modificado de Lefebvre S et al., 2014).

### Diagnóstico clínico de la displasia ectodérmica hipohidrótica

El diagnóstico temprano de la DEH es importante para prevenir complicaciones debidas a un control deficiente de la temperatura corporal durante el período neonatal. El diagnóstico se puede realizar con base en la clínica de pacientes con el síndrome clásico, pero puede ser difícil en casos parciales y en las portadoras de las mutaciones causantes de la enfermedad. En estos últimos casos es necesario realizar pruebas adicionales para demostrar un decremento en la sudoración o en el número de glándulas sudoríparas. La prueba de Yodo-almidón es útil para confirmar la ausencia de sudoración, la ausencia es generalizada en los individuos afectados e irregular en las mujeres portadoras.

Las portadoras tienen una mezcla de glándulas exocrinas con función normal y glándulas con función reducida, en el examen de áreas amplias del cuerpo como la espalda se puede apreciar la distribución en mosaico. Además dicho examen es útil para la diferenciación de portadoras de DEH ligada al X y de portadoras afectadas por formas autosómicas, ya que en las últimas la función de las glándulas sudoríparas está prácticamente ausente. Otros métodos para evaluar la afectación del mecanismo de sudoración incluyen: iontoforesis en la que después de aplicar pilocarpina en el antebrazo, se hace el conteo de poros de sudor y medición de la conductancia y temperatura de la piel. Estos últimos métodos son menos sensibles para aquellos pacientes con función glandular residual. La biopsia de piel no es necesaria para confirmar el diagnóstico, sin embargo el demostrar la ausencia de glándulas tiene un valor positivo predictivo. El análisis molecular de la DEH es la única manera de determinar qué genes están involucrados, detectar portadoras de la mutación y confirmar el tipo de herencia. Esta información es vital para el asesoramiento genético de la familia (García-Martín P. et al., 2013).

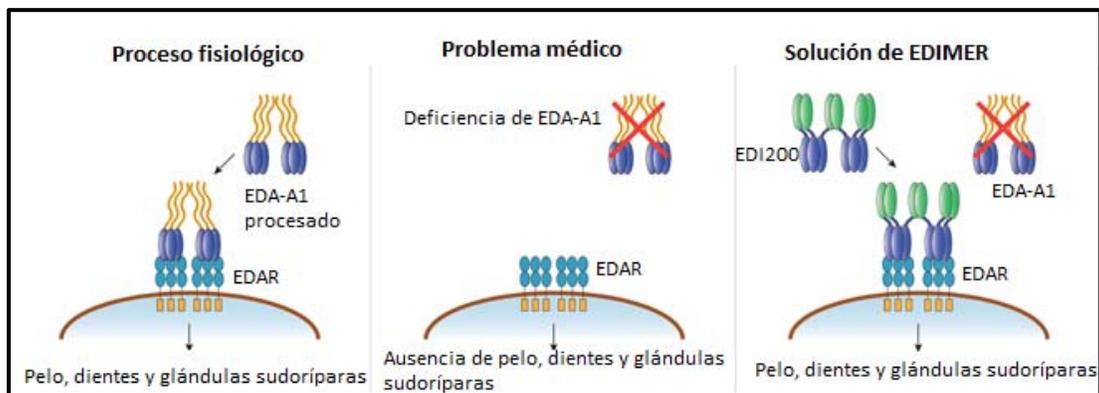
### **Manejo y pronóstico de la displasia ectodérmica hipohidrótica**

Por muchos años la tasa de mortalidad de los niños con DEH se consideró alrededor del 30% durante la infancia temprana, sin embargo, en la actualidad se considera de aproximadamente 13%. Las complicaciones aparecen en el primer año de edad debido a la hipertermia y a las infecciones respiratorias, después de la infancia la expectativa de vida es normal. La educación de los pacientes y sus familiares es vital para prevenir la hipertermia. La actividad física no se debe evitar por completo pero se debe concientizar a los pacientes y sus familiares que las temperaturas corporales altas causan síntomas como dolor de cabeza, náusea-vómito, mareo, fatiga y calambres.

Los familiares deben conocer técnicas para reducir la temperatura corporal (inmersión en agua, aire acondicionado, bebidas refrescantes, dispositivos refrigerados, entre otros). Los deportes acuáticos son ideales para estos pacientes. Por otro lado, no existe tratamiento para los desórdenes de la piel asociados a la DEH o para la hiperpigmentación peri-ocular y los brotes de dermatitis atópica pueden ser difíciles de tratar. Algunos autores sugieren que los pacientes con DEH tienen un riesgo elevado para desarrollar melanoma y por lo tanto se recomienda realizar un examen físico completo una vez al año (Gregoriou S et al., 2007).

El manejo de los niños con DEH también incluye tratamiento dental temprano para prevenir hipoplasia maxilar y atrofia de las encías cuyo daño severo puede impedir el desarrollo del lenguaje y de la masticación además de ser un problema estético. Otros especialistas que deben participar en el manejo de los pacientes incluyen por ejemplo a los otorrinolaringólogos cuando hay problemas de secreción nasal y de cerumen, oftalmólogos cuando hay resequedad de los ojos o problemas con las pestañas, neumólogos cuando hay eventos de infección en vías respiratorias y en algunos casos se sugiere acompañar con terapia psicológica (Lu PD et al., 2008).

Se han realizado diversas investigaciones para encontrar tratamientos para DEH entre ellos se ha desarrollado la EDI200 por la compañía EDIMER, una empresa privada (*Edimer Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA*). EDI200 es una forma de ectodisplina recombinante para el tratamiento de pacientes con DEH ligada al X (Figura 2). Actualmente este ensayo clínico se encuentra en estudio fase 2 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) NCT01564225 y NCT01775462) (Huttner K 2014).



**Figura 2.** Mecanismo de acción del fármaco biotecnológico EDI200 para el tratamiento de la displasia ectodérmica hipohidrotica ligada al X. (Tomada de <http://edimerpharma.com/information-for-patients/treatment-for-x-linked-hypohidrotic-ectodermal-dysplasia/>).

## Bases moleculares de la displasia ectodérmica hipohidrótica

La comprensión de los eventos moleculares que explican la DEH se ha centrado en el estudio de las mutaciones en los genes que codifican para proteínas relacionadas a la vía de señalización del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) que participan en la transducción de señales entre el ectodermo y el mesénquima durante el desarrollo fetal y que son esenciales para la diferenciación de los derivados del ectodermo (Trzeciak WH et al., 2016).

### **EDA**

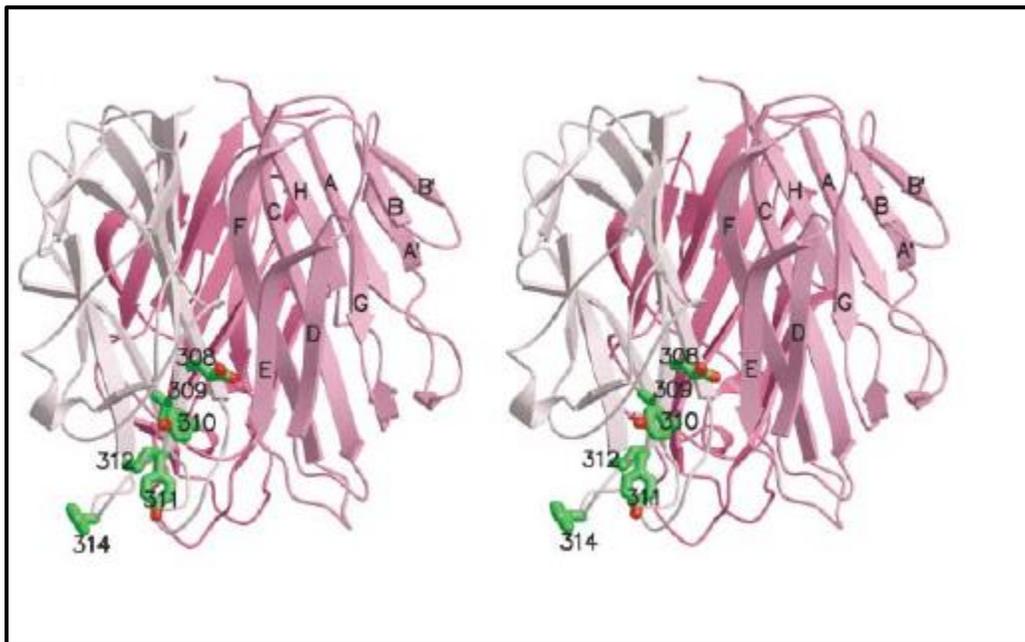
El gen *EDA* se identificó por primera vez por clonación posicional en pacientes con DEH en el brazo largo del cromosoma Xq12-q13.1 (Kere J et al., 1996). *EDA* es un integrante de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), contiene 8 exones y tiene varios cortes y empalmes alternativos que producen 13 isoformas distintas. El transcrito más largo tiene una longitud de 5,307 pb y codifica un producto de 391 aa.

A la fecha, se han reportado aproximadamente 270 mutaciones diferentes en *EDA* (HGMD), la mayoría de las mutaciones se localizan en los exones 1, 2 y 8 y son mutaciones puntuales dentro de los cuatro dominios funcionales de *EDA*. Las variaciones en el número de copia (CNV) que incluyen inserciones y deleciones intragénicas, o deleciones grandes que incluyen la pérdida de exones o del gen completo también se reportaron pero en mucho menor proporción comparadas con las variantes de secuencia (Pääkkönen K et al., 2001).

El gen *EDA* codifica para la ectodisplasina A que es una proteína transmembranal tipo II con un dominio intracelular N-terminal, un dominio extracelular más largo que contiene un repetido parecido a colágena (Gly-X-Y)<sub>19</sub> y un dominio C-terminal de homología a TNF. Las isoformas más comunes son EDA-A1 (391 aa) y EDA-A2 (389aa) que promueven la transcripción génica uniéndose a distintos receptores, EDA-A1 se une a EDAR y EDA-A2 a EDA2R (Pääkkönen K et al., 2001).

EDA es un trímero formado por 3 monómeros; cada uno conformado por dos hojas  $\beta$  anti paralelas en forma enrollada (*"jelly roll sandwich"*), dando lugar a las siguientes hojas  $\beta$ ; A'AHCF y B'BGDE con sus respectivos tallos asa CD, EF, DE y AA (Figura 3). La especificidad de la isoforma 1 de EDA que se une a EDAR, difiere de la especificidad de la isoforma 2 de EDA que sólo se une a EDA2R. Dicha especificidad recae en dos aminoácidos presentes en la isoforma 1 y ausentes en la isoforma 2 (Glu308, Val309), estos dos aminoácidos forman la porción carboxilo terminal de la cadena C seguidos por un bulto  $\beta$  formado por los aminoácidos Tyr310 y Tyr311 que se conectan a un tallo-asa de 6 residuos que une la cadena C con la D (Hymowitz S et al., 2003).

La Glu308 y Val309 forman parte de una cadena  $\beta$  e intervienen en varias interacciones con el tallo-asa adyacente GH y la cadena F. En particular, la conformación de la cadena lateral de la Glu308 es reforzada por puentes de hidrógeno con Thr333 en la cadena E del monómero vecino y con la Asn372 y Thr377 en el tallo asa GH adyacente (Hymowitz S et al., 2003) (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura de la isoforma 1 de EDA. Cada monómero se indica por las diferentes tonalidades de rosa, las letras indican las cadenas que forman cada hoja  $\beta$ . (Tomada de Hymowitz SG et al., 2003).

## **EDAR**

El gen *EDAR* localizado en el cromosoma 2q13 está constituido por 12 exones, su transcrito tiene una longitud de 4,214 pb y codifica para un producto de 448 aa. Su producto proteínico es un miembro típico de la súper familia de receptores de TNF con un péptido señal, tres dominios ricos en cisteína (DRC), un dominio transmembranal y una región intracelular que contiene el llamado dominio de muerte (Figura 4) (Kowalczyk-Quintas C et al., 2014).

La mayoría de las mutaciones en pacientes con DEH autosómica se localizan dentro del DRC2 de *EDAR*, necesario en la unión con el ligando o en el dominio de muerte que interviene en la transducción de la señal. Al respecto, se ha reportado un polimorfismo con función activadora p.Val370Ala dentro del dominio de muerte de *EDAR* con una alta prevalencia en asiáticos orientales y en poblaciones americanas nativas y se asocia con un fenotipo de cabello delgado. En los receptores de muerte Fas y TRAILR2, el dominio de muerte recluta proteínas asociadas a FAS que a su vez reclutan y activan cisteín-proteasas de la familia de las caspasas para ejecutar la muerte celular por apoptosis. *EDAR* no interacciona con FADD, sin embargo recluta a *EDARADD*, otra proteína adaptadora con dominio de muerte (Headon DJ et al., 2001).

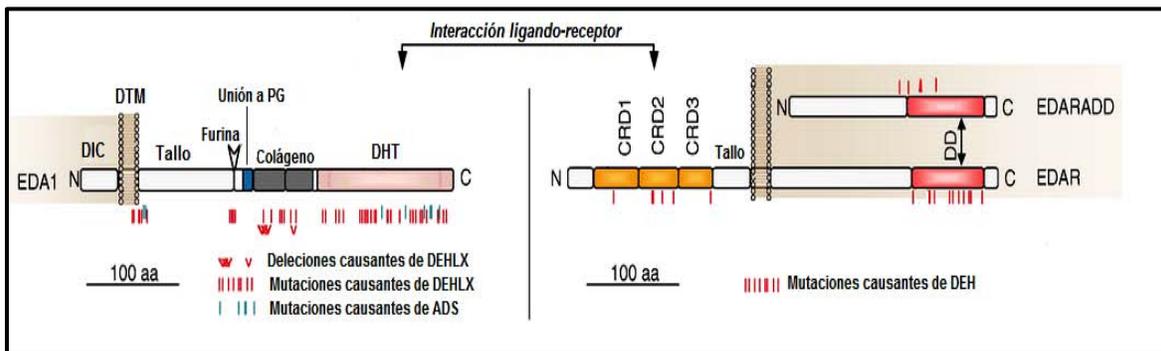
## **EDARADD**

El gen *EDARADD* localizado en el cromosoma 1q42.2-q43 tiene 6 exones, su transcrito tiene una longitud de 3,097pb y traduce para un producto de 205 aa que funciona como un adaptador con dominio de muerte, interacciona con *EDAR* y une al receptor con vías de señalización subsecuentes. En 2001 Headon DJ et al., identificaron la mutación responsable para el fenotipo “*crinkled*” en el ratón, una fenocopia de DEH idéntica a las mutantes “*downless*” en *EDAR* y “*tabby*” en *EDA*. La proteína *EDARADD* en ratón y en humano presentan un 80% de homología, con semejanza casi completa en el dominio de muerte que se localiza en el carboxilo terminal y es similar al dominio de muerte de MyD88, un transductor citoplásmico de la señalización de receptores Toll/interleucinas (Headon DJ et al., 2001).

*EDARADD* también contiene una secuencia consenso de unión a Traf. Headon DJ et al., 2001 identificó que *EDAR* y *EDARADD* co-expresan en células epiteliales durante la formación del folículo piloso y de los dientes y que *EDARADD* también se auto asocia, una propiedad común de varias proteínas con dominios de muerte (Headon DJ et al., 2001). La

sobreexpresión de EDARADD en células HEK293T resulta en la activación del gen reportero de NF- $\kappa$ B de manera dosis-dependiente. Headon DJ y colaboradores también observaron que EDAR es activado por EDA y utiliza a EDARADD como un adaptador para construir un complejo de señalización intracelular.

Esta vía de señalización lineal explica los fenotipos idénticos de las tres mutantes murinas y también la heterogeneidad genética de la DEH humana. En miembros de una familia consanguínea con DEH autosómica recesiva se identificó una mutación en estado homocigoto en *EDARADD* (Headon DJ et al., 2001). Bal et al., identificaron una mutación en estado heterocigoto en *EDARADD*, en una familia marroquí con DEH autosómica dominante (Bal et al., 2007). Mediante estudios funcionales de expresión demostraron que ambas mutaciones reducen la activación de NF- $\kappa$ B e interfieren en la interacción EDAR-EDARADD (Figura 4). Por lo tanto, las mutaciones en *EDARADD* ocasionan ambas formas hereditarias de DEH, indicando una vía patogénica común.



**Figura 4.** Esquema de la localización de las mutaciones en los dominios de las proteínas asociadas con DEH. AGS: Agnesia dental selectiva; C: extremo carboxilo terminal; CRD1-3: dominios ricos en cisteína 1-3; DD: dominio de muerte; DEHLX: displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al X; DHT: dominio con homología al factor de necrosis tumoral; DIC: dominio intracelular; DTM: dominio transmembranal; EDA1: isoforma 1 de la ectodisplasina; EDAR: receptor de ectodisplasina; EDARADD: dominio de muerte asociado al receptor de ectodisplasina; N: extremo amino terminal; PG: proteoglicanos. (Imagen modificada de Kowalczyk-Quintas C. et al., 2014).

## Vía de señalización de la ectodisplasina

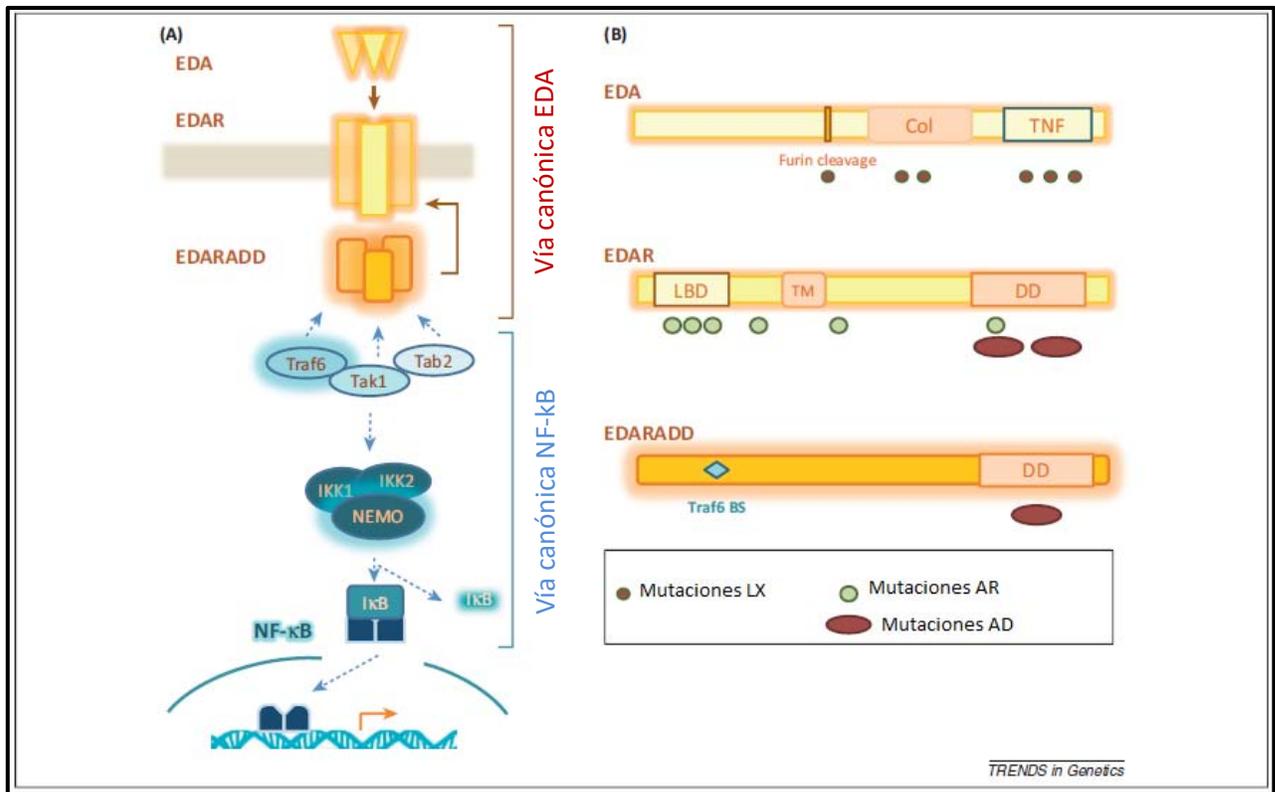
La vía de la ectodisplasina que se activa durante el desarrollo de los órganos ectodérmicos, incluyendo dientes, cabello, uñas y glándulas sudoríparas, es importante para un desarrollo funcional de las redes génicas que controlan el número, tamaño y densidad de estas estructuras. Esta vía fue identificada estudiando pacientes afectados por DEH y compromete a tres productos génicos principales: EDA, un ligando de la familia de TNF; EDAR, un receptor relacionado con los receptores de TNF $\alpha$  (TNFR) y EDARADD, un adaptador específico. La vía se centra en la activación subsecuente de la señalización NF-kB que regula la expresión de ciertos genes (Figura 5).

### De EDA a la vía NF-kB

Dada la similitud del síndrome clínico DEH que es resultado de las mutaciones en los tres genes descritos y de sus tres homólogos en ratón, no sorprende que los tres productos funcionales de dichos genes formen una vía de señalización lineal. El ligando trimérico EDA se une a su receptor trimérico EDAR que a su vez recluta a su adaptador EDARADD a través de la interacción de sus dominios de muerte (Figura 5) (Mikkola ML 2008).

Otra proteína producto del gen *Eda*, EDA-A2, es resultado de la eliminación de dos aminoácidos por corte y empalme alternativo. EDA-A2 se une a otro TNFR (EDA2R), previamente llamado XEDAR. Un reporte de un caso único sugiere que la pérdida de función de este gen se asocia a DEH aunque el modelo *knockout* de ratón no induce un fenotipo parecido a la DEH (Wisniewski, S.A. et al., 2012).

La cascada EDA-EDAR-EDARADD es reminiscente de otras vías de TNF (por ejemplo, TNF-TNFR-TRADD) por lo que se hipotetizó que esta señalización conduciría a la activación de la vía NF-kB, lo cual se demostró *in vitro* y se confirmaron las moléculas participantes: TAB2, IKK y TRAF6 en la activación de la vía NF-kB (Sadier A et al., 2014).



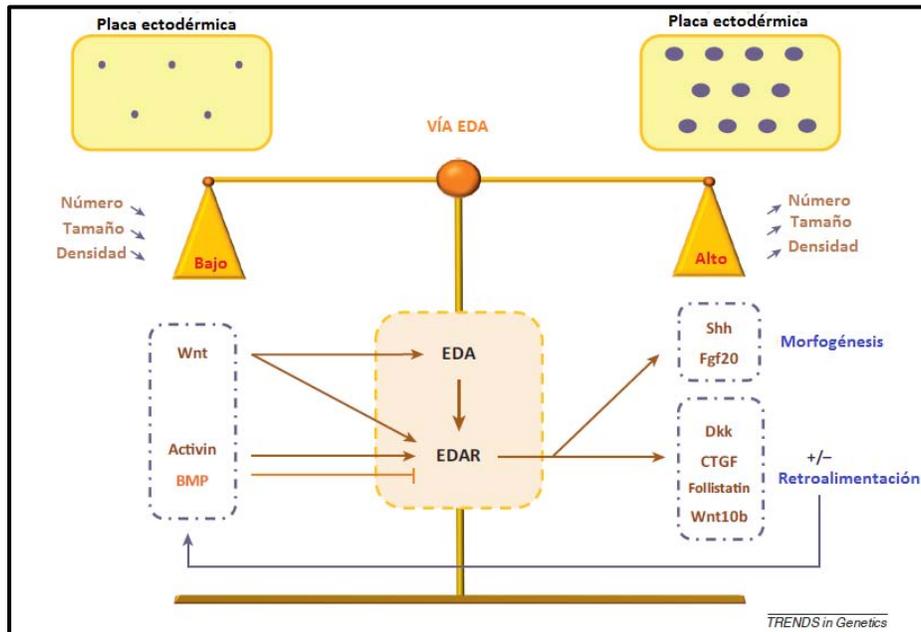
**Figura 5.** Vía canónica de la ectodisplasia. A) Modelo principal de la vía de señalización subsecuente de EDA. El ligando trimérico EDA se une a su receptor trimérico EDAR lo que conduce al reclutamiento de EDARADD y a la formación del complejo EDARADD, Traf6, Tab2 y Tak1. Tak1 activa el complejo IKK (IKK1, IKK2 y NEMO), el cual ubiquitina IκB y libera al factor NF-κB. Después NF-κB es traslocado al núcleo para la activación de genes. B) Proteínas EDA, EDAR y EDARADD con sus dominios funcionales. Col: dominio de colágeno; DD: dominio de muerte; LBD: dominio de unión a ligando; TM: dominio transmembrana; TNF: dominio TNF; Traf6BS: sitio de unión a Traf6. Se indican los sitios donde se encuentran las mutaciones principales. (Figura modificada de Sadier A et al., 2014).

La implicación de la vía NF-κB en el desarrollo ectodérmico sí resultó sorprendente porque es bien conocido su papel principal en procesos de inflamación e inmunidad actuando subsecuentemente en la activación de receptores inmunológicos TNF. En contraste, la activación de NF-κB vía EDA no parece estar relacionada a procesos inflamatorios (Gilmore TD et al., 2012).

Existen otras vías de señalización que también participan en el desarrollo del ectodermo, incluyendo a Wnt, Fgf, BMP y *hedgehog*. Sin embargo, la mayoría de estas vías son altamente pleiotrópicas y la disrupción en alguno de sus componentes produce defectos graves en el desarrollo no sólo en el ectodermo, sino también en otros órganos. En

contraste, la ausencia de algún factor de la señalización de EDA afecta específicamente órganos ectodérmicos y generalmente no imposibilita el desarrollo de dichos órganos, sino que únicamente se presentan defectos en términos de forma, tamaño, número o posición en el organismo. La señalización de EDA juega un papel importante en el ajuste fino del tamaño, espaciamiento, posición y forma de los órganos ectodérmicos en vertebrados (Sadier A et al., 2014).

Esta participación de ajuste de la señalización de EDA se refleja gracias a su posición integral en la red génica que controla el desarrollo de los apéndices ectodérmicos. Análisis del desarrollo de pelo y dientes en ratón han caracterizado la posición central de la señalización de EDA respecto a otras vías de señalización involucradas en el desarrollo del ectodermo (Mikkola ML, 2008). La vía de Wnt regula tanto a EDA como a EDAR, las vías de activina y BMP también regulan a EDAR. Estudios funcionales y de transcriptómica han identificado blancos de EDAR incluyendo Shh, FGF20 y los antagonistas de Wnt-BMP (Dkk4, CCN2/CTGF y folistatina), en la Figura 6 se ilustra un modelo para la señalización de EDA en la regulación del desarrollo de placas ectodérmicas que preceden a los órganos del ectodermo. Los reguladores de la vía de EDA se enlistan del lado izquierdo y los blancos del lado derecho (Figura 6). Se distinguen dos tipos de blancos, aquellos involucrados en la morfogénesis y aquellos que participan en asas de retroalimentación que son responsables del refuerzo local y rango de difusión de factores que controlan el destino de las placas, dando lugar a un ajuste fino del número, tamaño y posición de las placas. Debido a su posición río arriba o río abajo de vías de señalización claves en el desarrollo, la vía de EDA modula la fuerza y el rango de activación de otras vías (Figura 6) (Zhang Y et al., 2009; Häärä O et al., 2012).



**Figura 6.** Señalización de la ectodisplasina como modulador de otras vías de señalización claves en el desarrollo. (Modificado de Sadier A et al., 2014).

La especificidad de EDA en el desarrollo del ectodermo le ha permitido jugar un papel importante en los cambios morfológicos a través de la evolución, en contraste con otras vías de señalización importantes para el desarrollo, no es esencial y por lo tanto puede modificarse durante la evolución sin producir efectos pleiotrópicos letales (Sadier A et al 2014).

### **WNT10A**

El gen *WNT10A* se localiza en el cromosoma 2q35 y está conformado por 6 exones. (<http://www.omim.org/entry/606268>). La familia de los genes WNT está formada por varios miembros relacionados estructuralmente y que codifican para proteínas señalizadoras de secreción. Estas proteínas participan en varios procesos del desarrollo, incluyendo la regulación del destino celular durante la embriogénesis y en oncogénesis. La señalización Wnt es una de las pocas vías que son cruciales para el control de programas genéticos durante el desarrollo embrionario y en los tejidos adultos (Logan CY et al., 2004).

*WNT10A* se expresa en la piel y en la epidermis y ha demostrado ser crítico para el desarrollo de los apéndices del ectodermo. La señalización Wnt está altamente conservada evolutivamente, desde gusanos y moscas hasta vertebrados (Nelson W et al., 2004). Al eliminar varios genes *Wnt* en modelos de ratón, se ha observado que son letales o exhiben defectos graves del desarrollo, ilustrando la importancia de la señalización de Wnt en la embriogénesis. La señalización se inicia por uno de los 19 ligandos WNT que se unen y activan a receptores específicos como a los de las familias *frizzled* y LRP. La subsecuente transducción involucra la vía canónica de  $\beta$ -catenina y sus ramas no canónicas (Clevers H et al 2006). La función crítica de las proteínas WNT durante el desarrollo se evidenció por mutaciones en estado heterocigoto del gen que codifica *PORCN* que se ha sugerido participa en la palmitoilación y secreción de WNT. Las mutaciones en *PORCN* se asocian con la enfermedad multisistémica hipoplasia dérmica focal (Grzeschik KH et al., 2007).

Varios miembros de la familia WNT se expresan en la piel y durante la formación de los apéndices del ectodermo como el folículo piloso y los dientes. *WNT10A* y *WNT10B* se sobre expresan en la piel del embrión y en las placas del folículo piloso durante su morfogénesis, *WNT10A* parece ser un participante importante en la dentinogénesis, en la morfogénesis del diente y en la regulación de la diferenciación del odontoblasto (Nawaz S et al., 2009). Inactivación del cromosoma X y DEH ligada al X

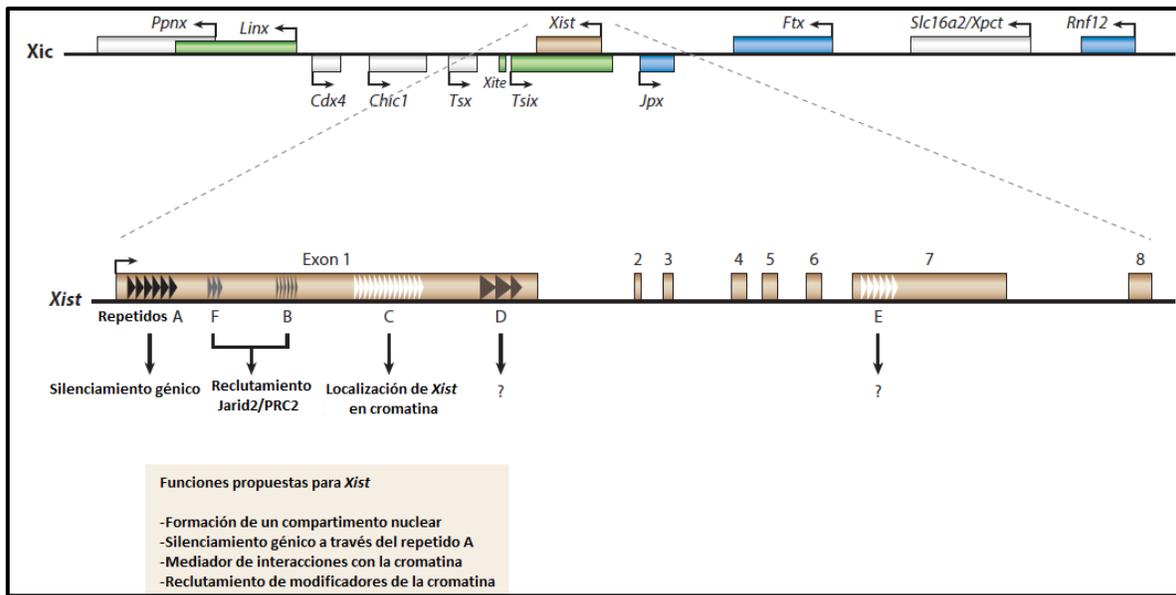
La compensación de dosis en las mujeres se logra a través de la inactivación de uno de sus cromosomas X, dicho proceso ocurre al azar y durante etapas tempranas del desarrollo y da como resultado mujeres que son mosaicos naturales para el cromosoma X (Lyon MF 1972 y Chaligné R et al., 2014). La reducción de la expresión génica del cromosoma X es resultado directo del proceso de inactivación y afecta prácticamente todas las regiones del cromosoma con solo unas pocas excepciones para genes que “escapan a la inactivación del X”.

En los mamíferos el sexo se determina por un par de cromosomas sexuales, el X y el Y. Los hombres son heterogaméticos (XY) mientras que las mujeres son homogaméticas (XX) y tienen dos copias funcionales de los genes con *loci* en el cromosoma X. A lo largo de la evolución el cromosoma X ha conservado su alta densidad génica, mientras que el cromosoma Y ha perdido la mayoría de sus genes, como resultado el cromosoma Y tiene muy pocos genes codificantes para proteínas comparado con otros cromosomas, lo que ha llevado a grandes diferencias en la dosis génica ligada al X entre hombres y mujeres que es compensada silenciando uno de los cromosomas X en mujeres, fenómeno conocido como inactivación del cromosoma X o ICX. La ICX comparte varias características con otros mecanismos epigenéticos tales como mosaico celular, heredabilidad mitótica pero

reversibilidad de la inactividad del cromosoma X, asincronía del tiempo de replicación del ADN comparado con el resto del genoma y finalmente una combinación de diversos mecanismos epigenéticos, incluyendo la metilación de promotores, modificaciones post-transcripcionales de histonas y una organización nuclear peculiar. Todos estos factores actúan de manera sinérgica para mantener el estado inactivo del cromosoma X (Chaligné R et al., 2014).

El centro de inactivación del X (CIX) se define como la región mínima del cromosoma X que contiene las secuencias suficientes y necesarias para la iniciación de la ICX y se localiza en el brazo largo del cromosoma X cerca del centrómero en Xq13. El CIX abarca hasta 1 MB y contiene varias secuencias codificantes para proteínas, así como varias secuencias no codificantes y genes para RNAs que impactan en la iniciación de la ICX (Figura 7). En el CIX se encuentra *Xist*, cuyo producto es un RNA no codificante y su transcrito antisentido *Tsix*. *Xist* fue descrito a inicio de la década de los noventa en ratones y humanos y es el principal elemento en el proceso de inactivación del X (Borsani et al 1991). *Tsix* se transcribe antisentido a *Xist* y regula su represión (Lee & Lu 1999).

*Xist* es un RNA largo no codificante (lncRNA) de 17 Kb de longitud que es procesado en el núcleo (corte y empalme, poliadenilado), similar al procesamiento de los RNAs mensajeros. Sin embargo, *Xist* aparentemente no tiene un marco de lectura abierto y no se exporta al citoplasma si no que se retiene en el núcleo donde cubre al futuro cromosoma X inactivo. Durante la diferenciación de las células femeninas *Xist* se sobre expresa de una manera mono alélica e induce el silenciamiento del cromosoma del cual se está expresando de una manera limitada a *cis*. Este perfil de expresión es altamente regulado e incluye varios genes participantes de la misma vía reguladora (Figura 7) (Gendrel AV et al., 2014).



**Figura 7.** Centro de inactivación del X (CIX) y *Xist*. El CIX abarca una amplia región compuesta por varios *loci* de RNAs no codificantes (*Xist*, *Tsix*, *Jpx*, and *Ftx*), así como de genes codificantes para proteínas, alguno de los cuales están involucrados en el proceso de ICX (*Rnf12*) y otros que aparentemente no. Presuntos reguladores positivos de la ICX (cajas azules) y presuntos reguladores negativos (cajas verdes). Abajo se encuentra representado el gen *Xist* que contiene 8 exones e incluye varios repetidos en tándem nombrados de la A a la F, indicándose la función de cada uno. En la parte inferior se discuten las diversas funciones de *Xist*. (Modificado de Gendrel Av et al., 2014).

Los varones con DEHLX presentan los rasgos fenotípicos característicos de la enfermedad sin embargo, en las mujeres portadoras de la mutación de forma heterocigota, la gravedad del desorden varía ampliamente inclusive dentro de la misma familia. Las portadoras pueden presentar de un grado menor a moderado los síntomas, pero algunas mujeres portadoras y debido a la inactivación del cromosoma X podrían presentar manifestaciones clínicas (Vincent MC et al., 2001; Fan H et al., 2008).

## **Justificación**

Debido a la heterogeneidad genética de la DEH es importante conocer el perfil mutacional para entender y aportar conocimiento nuevo sobre las características moleculares de esta patología, describiendo en nuestra población las alteraciones en cuatro genes asociados a DEH. Además, se aportará conocimiento nuevo al realizar la relación fenotipo-genotipo. La imposibilidad para sudar y su participación en la regulación de la temperatura cuando hay hipertermia puede amenazar la vida del paciente en particular de los recién nacidos, por ello un diagnóstico temprano y el asesoramiento genético de las familias es crucial cuando se sospecha de DEH.

## **Planteamiento del problema**

La DEH cuyo diagnóstico clínico se presenta principalmente en la consulta de dermatología pediátrica, es causada por mutaciones en por lo menos 4 genes identificados que participan en una misma vía de señalización, aunque no se ha identificado en todos los casos de DEH una mutación causante. En México se han reportado pocos casos de DEH con análisis molecular y no existe un análisis de tipo relación genotipo-fenotipo extenso en pacientes mexicanos y sus familias con DEH, por lo tanto, se desconoce el tipo y frecuencia de mutaciones en los genes causantes de DEH en nuestra población.

En México no se conoce el perfil mutacional de esta enfermedad y debido a que las formas de DEH causadas por mutaciones en diferentes genes son clínicamente indistinguibles, conocer el gen mutado en los pacientes con DEH permitirá conocer las causas moleculares de DEH en pacientes mexicanos, establecer la relación fenotipo-genotipo y se podrá otorgar asesoramiento genético basado en pruebas moleculares de certeza.

## **Hipótesis**

La mayoría de los casos de DEH en pacientes mestizos mexicanos serán causados por alteraciones en *EDA*, y una menor proporción de casos se explicará por alteraciones en *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* y las alteraciones genéticas se relacionarán con el fenotipo

## **Objetivo general**

Determinar el tipo y la frecuencia de alteraciones de los genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* en pacientes con DEH y relacionarlo con el fenotipo.

## **Objetivos particulares**

Caracterización de las mutaciones identificadas y análisis *in silico* de las variaciones no reportadas previamente.

Determinar si las mutaciones identificadas se tratan de mutaciones *de novo* o heredadas.

Identificar el patrón de herencia en aquellos casos positivos para alteraciones génicas.

Establecer la relación fenotipo-genotipo entre las mutaciones identificadas y el efecto de manifestaciones clínicas en los pacientes.

## **Sujetos y métodos**

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo. La población de estudio fueron dieciocho pacientes con DEH que acudieron a consulta a los Departamentos de Genética y Dermatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) en un período de dos años. Este protocolo fue autorizado por la Dirección de Investigación del HIMFG y contó con el apoyo de Fondos Federales para su realización, registro HIM 2013/011, se invitó a participar por medio de cartas de consentimiento informado para el protocolo y toma de fotografías clínicas.

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes masculinos o femeninos con diagnóstico clínico y/o histopatológico de DEH.
- Pacientes que aceptaran participar en el estudio con carta de consentimiento informado del protocolo aprobado por la institución.

### **Criterios de exclusión**

- Presentar enfermedad sistémica con contraindicación para toma de muestra.
- No desear participar en el estudio.

### **Criterios de eliminación**

- Muestra insuficiente.
- DNA en calidad o cantidad insuficiente para análisis.

## **Procedimiento para toma de muestra y extracción de DNA genómico**

Todos los pacientes fueron evaluados clínicamente por al menos un médico genetista y un dermatólogo pediatra. Se tomó 1 ml de sangre periférica para extracción de DNA genómico como se describe a continuación:

A un volumen de la sangre obtenida se le agregaron 3 volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR) [cloruro de amonio 0.155M, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.1mM] en un tubo para centrifuga. Esta mezcla se homogenizó por

inversión y se centrifugó a 3000 rpm/6min. Los componentes del BLGR generan un choque osmótico a las membranas de los eritrocitos y contiene ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) como quelante iónico.

Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se trabajó con el botón de las células mononucleares (CMN). Las células se resuspendieron con 1 mL de solución de BLGR y se centrifugaron a 3000 rpm/2min. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco. Después de decantar el sobrenadante, se agregaron 570µL de una solución de cloruro de sodio, NaCl [5mM] al botón de CMN y se dejó en agitación por 2 min. A esta reacción se adicionaron 40µL del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) [10% v/v], se homogenizó la reacción y después se le agregaron 200µL de una solución de cloruro de sodio 7M. La mezcla anterior se centrifugó a 11500 rpm/20min a 4°C.

La primera solución de NaCl genera un cambio en las proteínas de la membrana citoplasmática atrapando a las moléculas de agua que rodean a éstas, para que posteriormente puedan precipitar. El SDS al ser un tensoactivo, ocasiona la formación de micelas para disolver las membranas lipídicas del núcleo celular. Finalmente el NaCl saturado favorece la precipitación de las proteínas nucleares.

Después de centrifugar se obtiene un precipitado salino y proteico en el fondo del tubo y un sobrenadante viscoso. El sobrenadante que contiene el DNA se transfirió a un tubo limpio. Se realizó partición orgánica del sobrenadante, donde la fase orgánica son 600µL de una mezcla de alcohol isoamílico-cloroformo en una proporción 49:1 (v/v), se agitó y se centrifugó a 14000rpm/15min. La partición orgánica separa el DNA que es soluble en agua (fase superior) de los lípidos de la membrana. Después de centrifugar se retiró cuidadosamente la fase acuosa y ésta se pasó a otro tubo que contenía 600µL de etanol absoluto.

Se mezcló por inversión el sobrenadante con el alcohol para precipitar el DNA. La reacción se centrifugó a 14000 rpm/15min y se descartó el sobrenadante para quedarse con el botón de DNA. El botón se lavó con etanol al 70% (v/v) y se volvió a centrifugar de la misma forma. Se decantó el etanol y el botón de DNA se secó al vacío con temperatura baja (30-50°C). El DNA seco se resuspendió en 150µL de agua estéril y se incubó a temperatura ambiente durante toda una noche para homogenizar la solución.

### **Análisis cuantitativo y cualitativo de DNA**

Se realizó la cuantificación de las muestras en un espectrofotómetro Nanodrop® y se realizaron las diluciones de las muestras hasta una concentración final de 100ng/μl. En la cuantificación consideramos DNA de alta calidad, se incluyeron las soluciones con factor 260/280nm>1.75, 260/230nm>1.8, lo que nos indica un DNA libre de contaminantes.

### **Análisis por MLPA para detección de variaciones en el número de copia (CNV)**

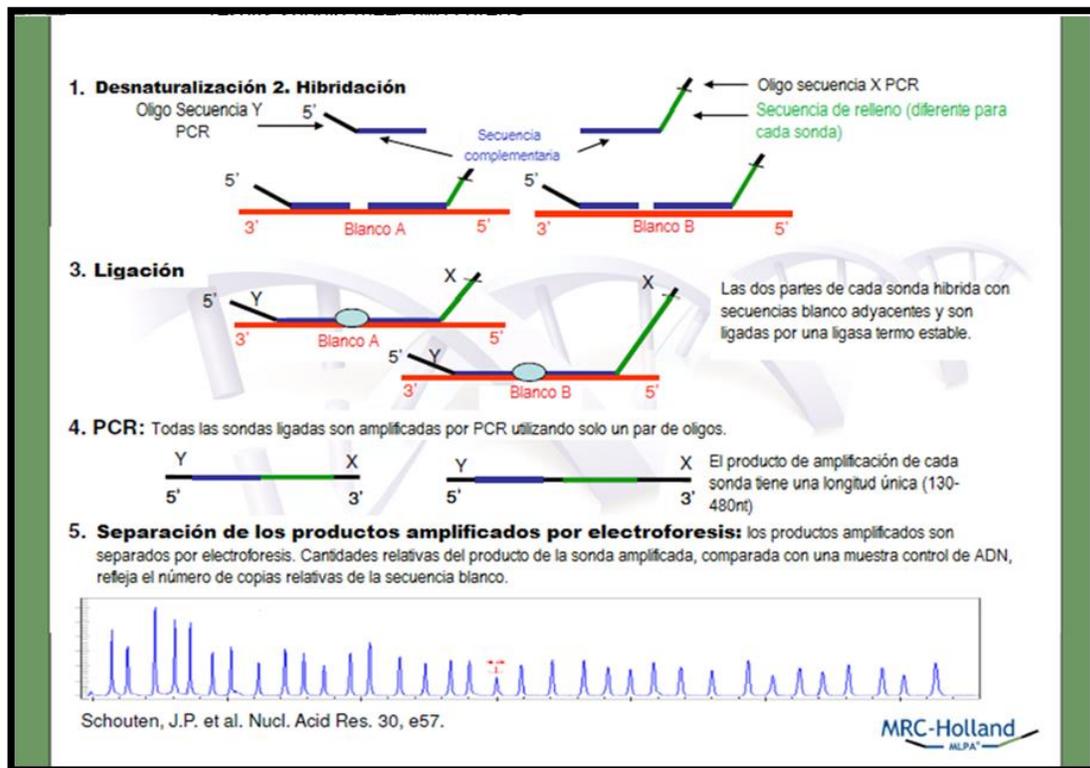
El estudio de los pacientes con diagnóstico clínico de DEH se inició con el análisis por MLPA (*Multiplex Ligation –Dependent Probe Amplification*) empleando SALSA MLPA P183-C1 EDA-EDAR-EDARADD-WNT10 de MRC-HOLLAND (Ámsterdam, Holanda) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Figura 8).

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position				
		Reference	EDA	EDAR	EDARADD	WNT10A
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
130 *	Reference probe 13351-L14781	8q24				
136 *	WNT10A probe 16457-L18910					Exon 1
142	EDAR probe 14199-L15813			Exon 7		
148	EDARADD probe 13478-L14940				Exon 3	
154	EDAR probe 13816-L15310			Exon 5		
160	Reference probe 07992-L07773	7q21				
166	EDA probe 14200-L15814		Exon 4			
172	EDARADD probe 13481-L14943				Exon 5	
178	Reference probe 05976-L05401	20p12				
190	EDA probe 08897-L08989		Exon 8			
196	EDA probe 06032-L05487		Exon 1			
202	EDARADD probe 13484-L15493				Exon 7	
211	EDA probe 06039-L05494		Exon 9b			
219	EDA probe 06034-L05489		Exon 4			
226	EDAR probe 12781-L13916			Exon 4		
232 *	Reference probe 16429-L18882	18q21				
238 ~	GLA probe 05160-L04564		Xq22.1			
248	EDA probe 06033-L05488		Exon 1			
256	EDA probe 06041-L05496		Exon 10			
262	EDARADD probe 14202-L16587				Exon 1	
267	EDAR probe 12782-L15494			Exon 3		
274	EDARADD probe 13479-L14941				Exon 4	
283	EDA probe 06035-L05490		Exon 5			
292	EDA probe 06037-L05492		Exon 7			
297 *	WNT10A probe 16460-L25670					Exon 4
303 ¥	EDAR probe 12783-L25671			Exon 11		
310 *	Reference probe 18380-L25673	10q22				
317	EDA probe 06040-L05495		Exon 10			
328 *	Reference probe 09227-L09545	5q23				
338	EDAR probe 12785-L15496			Exon 1		
346 ~	ATP7A probe 03149-L14468		Xq21.1			
355	EDAR probe 12786-L13921			Exon 8		
362	EDARADD probe 13482-L14944				Exon 6	
373 ¥	EDA probe 12784-SP0830-L26024		Exon 6			
382 *	WNT10A probe 16458-L18911					Exon 2
390 ¥	EDARADD probe 13477-L25672				Exon 1	
398 ~ ¥	EFNB1 probe 03764-L25674		Xq13.1			
409	EDAR probe 12787-L13922			Exon 2		
417	EDAR probe 13817-L15311			Exon 10		
425	EDAR probe 12789-L13924			Exon 6		
437 ¥	EDAR probe 12790-L19277			Exon 12		
449	EDARADD probe 13480-L14942				Exon 5	
454 *	Reference probe 02144-L01619	13q13				
463	EDARADD probe 13483-L14945				Exon 6	
474 *	WNT10A probe 16459-L18912					Exon 3
481	EDAR probe 14203-L15817			Exon 9		
493 *	Reference probe 09772-L22978	15q21				
503 *	Reference probe 06676-L23439	11p15				

Figura 8. Conjunto de sondas del SALSA MLPA P183-C1 EDA-EDAR-EDARADD, WNT10A. (Tomado de www.mrc-holland, Description version 10; 19-11-2013).

## MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

La amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA) se usa para determinar CNV de hasta 50 secuencias de DNA en un solo tubo de reacción basado en una PCR multiplex. Cada reacción de MLPA resulta en un conjunto de amplicones específicos entre 64 y 500 nucleótidos de longitud que son separados por electroforesis capilar (Figura 9). En el MLPA no se amplifica la muestra de DNA durante la PCR, sino las sondas de MLPA que hibridaron en la muestra de DNA. A diferencia de una PCR multiplex usa un solo par de oligonucleótidos para PCR que amplifica todas las sondas (Figura 9) ([www. mrc-holland](http://www.mrc-holland)).



**Figura 9.** Fundamento general de la técnica de MLPA. Se describe esquemáticamente el fundamento de los 5 pasos principales que conforman el MLPA (desnaturalización, hibridación, ligación PCR y separación capilar). (Modificada de [www.mrc-holland](http://www.mrc-holland)).

La secuencia a hibridar de cada sonda tiene una longitud de 55-80 nucleótidos. Cada sonda de MLPA consiste en dos oligonucleótidos que hibridan secuencias adyacentes del DNA blanco, para ser ligadas. Después de la ligación se forma una sola molécula de DNA que puede ser amplificada durante la PCR. Dado que la hibridación y la ligación son esenciales para que las sondas sean amplificadas y generen una señal, las sondas sin hibridar no amplificarán y por lo tanto no darán una señal, por lo que no es necesario eliminarlas del tubo de reacción. Después de la PCR, los amplicones son separados y cuantificados por electroforesis capilar. Cada sonda del paquete de MLPA tiene una longitud específica y por lo tanto se pueden identificar fácilmente.

La preparación previa de las muestras de DNA genómico para su análisis por MLPA de cada uno de los pacientes consistió en diluir el DNA a 50ng/ $\mu$ l en Tris-EDTA (TE) pH 8-8.5 (10mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1mM EDTA). Por cada 5 muestras analizadas se incluyeron 3 controles bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 10).

El procedimiento general de MLPA se divide en 5 etapas:

- 1) Desnaturalización
- 2) Hibridación-Ligación
- 3) PCR
- 4) Separación de los productos amplificados por electroforesis capilar
- 5) Análisis de los resultados utilizando *Coffalyser.net*

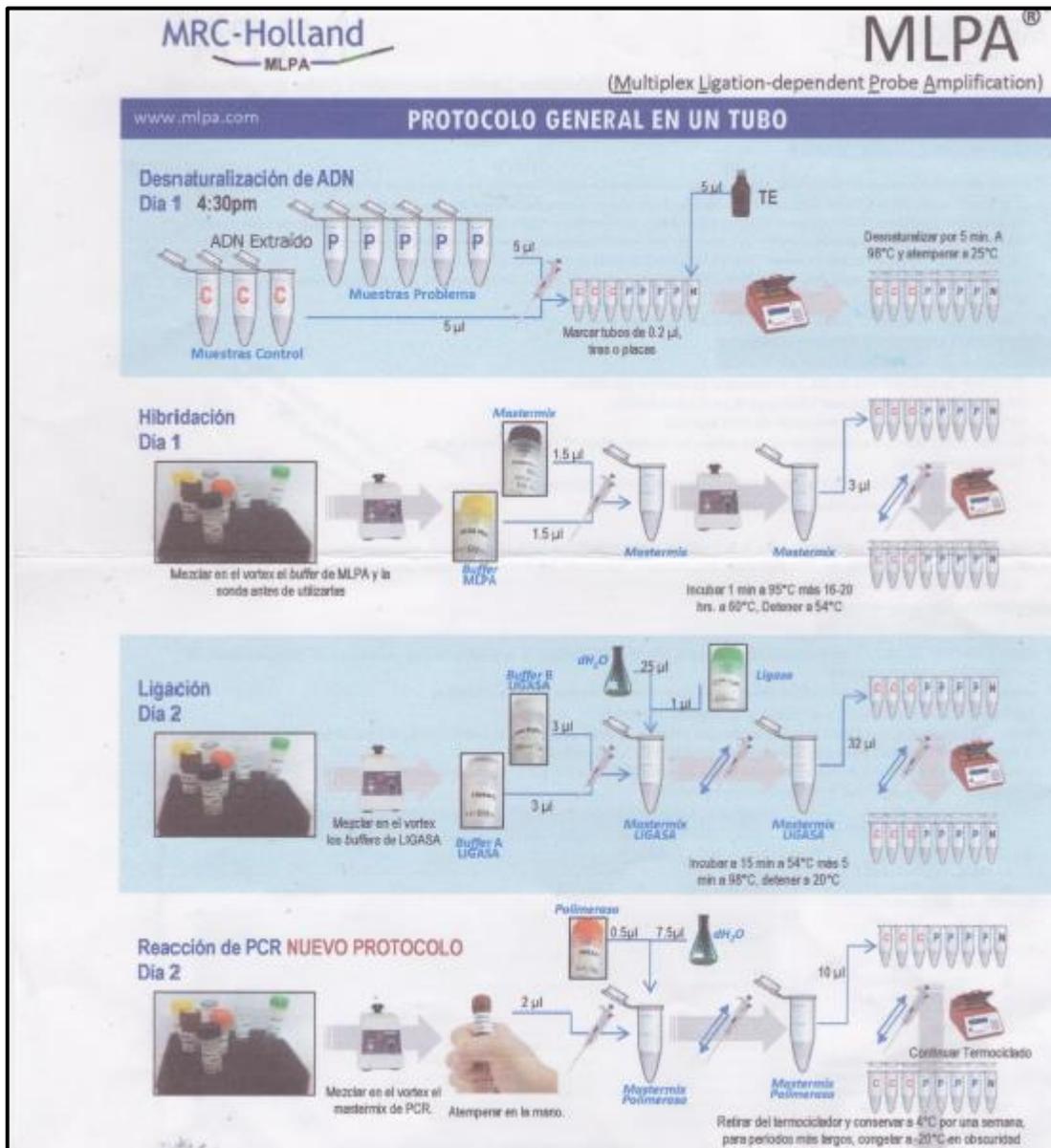


Figura 10. Pasos generales de la metodología de MLPA MRC-Holland<sup>®</sup>. (Tomado de [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)).

#### Desnaturalización:

En tubos etiquetados de 0.2mL se colocaron 5µl de las muestras de DNA genómico 50ng/µL en TE a estudiar con sus respectivos controles, se desnaturalizó por 5 min a 98°C y se atemperó a 25°C.

#### Hibridación:

Se preparó la mezcla de hibridación para cada muestra que consistió en:

Amortiguador de MLPA 1.5µL

Master mix (sondas) 1.5µL

Se agregó la mezcla de reacción (3µL) a cada tubo con su respectiva muestra, se incubó un minuto a 95°C más 16-20 horas a 60°C y la reacción se detuvo a 54°C (Figura 10).

#### Ligación:

Se preparó la mezcla de ligación que consistió en

3µL de amortiguador ligasa A

3µL de amortiguador ligasa B

25µl de agua desionizada

1µl de la enzima ligasa

Se agregó la mezcla de ligación (32µl) a cada tubo con su respectiva muestra, se incubó 15 min a 54°C más 5 min a 98°C y se detuvo a 20°C.

#### Reacción de PCR:

Previamente se preparó la mezcla de reacción de PCR de la siguiente manera:

Mezcla de PCR 2µl

DNA Polimerasa 0.5µl

Agua desionizada 7.5µl

Se agregó la mezcla de reacción de PCR (10µl) a cada tubo con su respectiva muestra, las muestras se amplificaron con el siguiente programa de PCR (Tabla 1).

**Tabla 1.** Programa de PCR-MLPA

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
35	95	30s
	60	30s
	72	60s
1	72	20min
-	15	Pausa

Se procedió al análisis por electroforesis capilar en secuenciador automatizado, se preparó la mezcla de inyección de la siguiente manera:

Reacción de PCR 0.7µl

Marcador de peso molecular (LIZ 500, AB) 0.2µl

Formamida desionizada 9µl

Los resultados fueron analizados utilizando el programa *Coffalyser.net* y para la cuantificación relativa se utilizaron los criterios de la Tabla 2.

**Tabla 2.** Criterios para la cuantificación relativa.

Número de copia	Coficiente de Dosis (CD)
Normal	0.85<CD<1.15
Duplicación heterocigota	1.35<CD<1.55
Triplicación	1.70<CD<2.20
Delección heterocigota	0.35<CD<0.65
Delección homocigota	0
Número de copia ambigua	Otros valores

Sólo en un caso con alteración de dosis (caso 1), se realizó PCR de punto final, utilizando como control interno el gen *SRY* (procedimiento detallado en la sección de PCR).

### **Detección del sesgo en la inactivación del cromosoma X**

En dos portadoras de la familia del paciente 1 se realizó el análisis de la inactivación del cromosoma X (ICX) para distinguir y evaluar el porcentaje de células que tienen activo cada cromosoma X parental. La metilación de los residuos CpG de los promotores en los genes es un mecanismo de silenciamiento transcripcional. En este protocolo se usa la región (CAG)<sub>n</sub> del extremo 5' de la región codificante del gen del receptor de andrógenos humano (*HUMARA*, por sus siglas en inglés), ubicado en Xq11.2, para distinguir y comparar la metilación de los dos cromosomas X. Esta región es altamente polimórfica y por ello generalmente heterocigota.

Se realizaron las restricciones enzimáticas para cada muestra de DNA, una con enzima sensible a metilación *HpaII* y otra sin enzima. Se incluyó un control positivo con patrón de ICX no aleatorio. Las muestras predigeridas se amplificaron por PCR, se separaron mediante electroforesis capilar (AB3130, programa *GeneMapper* v4.0) y se compararon las áreas de los picos de los dos alelos *HUMARA* para determinar el patrón de iX en la población celular original de la que se obtuvo el DNA (Jones JR., 2014).

A continuación, se describe el ensayo basado en PCR para el análisis de la ICX:

Se tomó la muestra de DNA genómico de sangre periférica y se pre-digerieron con una endonucleasa de restricción sensible a metilación *HpaII*. Esta enzima sólo corta el sitio de reconocimiento de DNA cuando la isla CpG adyacente está hipometilada, por lo tanto, solo el gen *HUMARA* activo en el cromosoma X activo es digerido.

Después de la restricción del DNA, las muestras pre-digeridas se amplificaron por PCR y solo las regiones que están metiladas y por lo tanto no digeridas, fueron amplificadas exitosamente. Los productos de PCR de la digestión de DNA con *HpaII* se compararon con otra alícuota de la misma muestra de DNA amplificado sin digerir por *HpaII*. La comparación

del área de los picos de los dos alelos *HUMARA* dio información suficiente para determinar el patrón de inactivación del X en la población celular original de la que se obtuvo el DNA.

El ensayo de inactivación del cromosoma X incluye cuatro pasos:

- 1) Restricción enzimática sensible a metilación (pre-digestión)
- 2) PCR
- 3) Separación por electroforesis capilar
- 4) Análisis de datos

Materiales:

NEBuffer 1 (*New England Biolabs*)

10U/ml *HpaII* endonucleasa de restricción

100ng/ml muestra de DNA genómico

100ng/ $\mu$ l muestra de DNA que haya presentado previamente un patrón de inactivación del X no al azar

Tubos para micro centrífuga

Termociclador

### 1) Restricción enzimática sensible a metilación.

1.1 Se prepararon dos reacciones de restricción enzimática por cada muestra de DNA, una con enzima y otra sin enzima.

Se prepararon las siguientes dos mezclas de reacción en tubos para micro centrífuga estériles y etiquetados, combinando los reactivos en el orden indicado (volumen total 12.5 $\mu$ l)

Reacción 1: reacción de pre-digestión *HpaII*:

5.25 $\mu$ l de agua desionizada

1.25 $\mu$ l de NEBuffer 1

1.0 $\mu$ l 10U/ $\mu$ l *HpaII*

5µl 100ng /µl de DNA (~500ng DNA)

Reacción 2: Control negativo (No *HpaII*)

6.25 µl de agua desionizada

1.25 µl NEBuffer 1

5 µl 100ng/µl de DNA (~500ng DNA)

1.2 Como control positivo se prepararon las dos mezclas de reacciones anteriores usando una muestra de DNA que haya presentado un patrón alto de inactivación del cromosoma X no al azar.

1.3 La reacción se incubó en un termociclador a 37°C por 120 min.

1.4 Se finalizó con una incubación a 65°C para desactivar a *HpaII*.

1.5 Se procedió a la amplificación por PCR.

## 2) Amplificación por PCR.

En este protocolo la PCR se realizó para las reacciones pre-digeridas y no digeridas de los templados de DNA generados en el paso anterior. Un paso clave es la cuantificación precisa del área del pico del alelo *HUMARA*, después de la amplificación.

2.1 Se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra (incluido control positivo y control negativo)

6.0 µl de agua desionizada

1.25 µl de Buffer de reacción para PCR 10X

1.0 µl de la mezcla de dNTP [1.25mM]

1.0 µl de oligonucleótido sentido etiquetado [1 pmol/µl]

0.25 µl de oligonucleótido antisentido no etiquetado [5 pmol/µl]

1.0 µl Red *Taq* DNA polimerasa [1U/ml]

Volumen total de la reacción: 10.5µl

2.2 Se colocaron alícuotas de 10.5 µl de la mezcla de reacción por cada muestra en el pozo adecuado de la placa de PCR previamente etiquetada.

2.3 Se añadieron 2 µl de la reacción de digestión *HpaII* (50ng/µl) y de las muestras de DNA del control positivo y negativo.

2.4 Se colocó la placa de PCR en el termociclador y se realizó la PCR (Tabla 3).

**Tabla 3.** Programa de PCR del ensayo ICX

No. Ciclos	Tiempo	Temperatura	Proceso
1 ciclo	3 min	94°C	Desnaturalización
	30s	94°C	Desnaturalización
19 ciclos	30s	60°C	Alineamiento
	45s	72°C	Extensión
Paso final	-	4°C	Pausa

### 3) Separación de productos de PCR por electroforesis capilar

3.1 Se añadieron 3µl de la solución de paro/marcador de peso IR2 a cada una de las muestras de 12.5µl. Se mezcló vigorosamente por pipeteo.

3.2 Se desnaturalizó a 93°C por 3 min en un termociclador e inmediatamente se transfirió en hielo.

3.3 Se corrieron los productos digeridos de PCR con los no digeridos en el analizador de ADN (AB3130, programa *GeneMapper* v4.0) con su respectivo marcador de peso molecular, siguiendo las instrucciones del manual de operación del equipo. Los productos son de aproximadamente de 250-300pb.

### 4) Análisis del porcentaje de Inactivación del cromosoma X

Se determinó la relación relativa de activación/inactivación para los alelos del receptor de andrógenos de cada muestra, primero identificando los dos picos correspondientes a los dos alelos del cromosoma X en la muestra no digerida y normalizando la densidad de los

picos. Después se multiplicó el factor de normalización por la relación del pico de la muestra digerida. Para la normalización y cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{[ \text{área pico 2 predigerido} ] \times 100}{[ \text{área pico predigerido} ] \times [ \text{área pico 2 no digerido} ] + \text{área pico 2 predigerido}} = \% \text{ actividad pico 1}$$

### Secuenciación

En los casos negativos para mutaciones estructurales de los cuatro genes incluidos en el panel de MLPA, se realizó secuenciación directa de los ocho exones y 392 pb del intrón 1-2 de *EDA* con sitios potenciales que afectan el procesamiento del mRNA. En los cuatro pacientes masculinos y en uno femenino, negativos para *EDA* se procedió a secuenciar *EDAR*, y posteriormente *EDARADD* en 3 pacientes masculinos y uno femenino negativos para variaciones en *EDAR*. En los 18 pacientes se analizó el polimorfismo rs3827760 de *EDAR* asociado a fenotipo de cabello delgado y dientes en forma de pala en poblaciones asiáticas y amerindias.

### Reacción de PCR

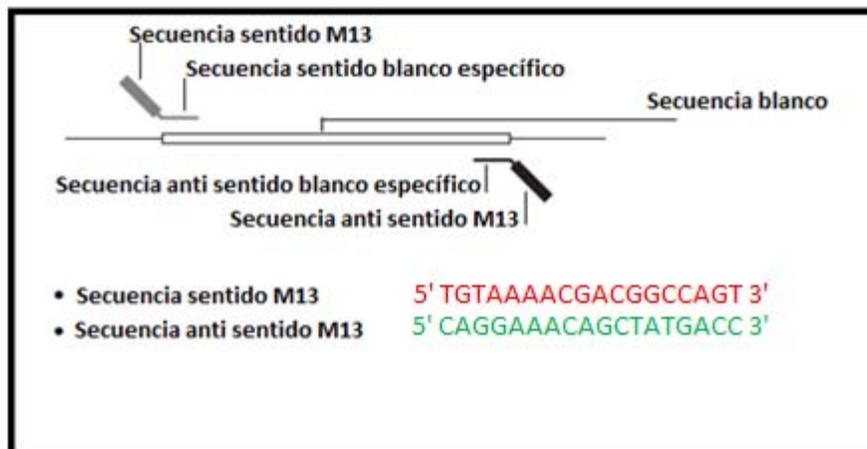
Se realizó la PCR con oligonucleótidos específicos para los exones de los genes *EDA*, *EDAR* y *EDARADD*, previamente publicados (Cluzeau C. et al., 2010) modificados con una secuencia del fago M13 (Tabla 4 y Figura 11) y siempre verificando la presencia de una sola banda en el amplicón, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

**Tabla 4.** Características de los oligonucleótidos de los exones de *EDA*, *EDAR*, *EADRADD* utilizados para la secuenciación.

Oligonucleótido	pb	Secuencia 5'-3'	Tm(°C)	AC	AC3'	TP(pb)
EDA1F	39	TGTA AACGACGGCCAGT CCGGAGTAGAGCTGCACATGCG	63.68	4	4	748
EDA1R	39	CAGGAAACAGCTATGACCACCGAAGACAACCTGCCCTGG	64.66	3	3	
EDA_IF	40	TGTA AACGACGGCCAGT TGGCTTCTCTAGTTAGGTTGGG	59.16	4	0	392
EDA_IR	40	CAGGAAACAGCTATGACCCATCTCAAATTTTCTTCTGCG	55.32	6	0	
EDA2F	38	TGTA AACGACGGCCAGT GGGCTCAGGCTTTAGACACA	59.68	4	0	832
EDA2R	38	CAGGAAACAGCTATGACCGAGATGAGGCCCTTATAGAG	53.81	7	4	
EDA3F	39	TGTA AACGACGGCCAGT AGGAGTCAGAAGACAGAATGG	56.74	3	0	433
EDA3R	39	CAGGAAACAGCTATGACCAAGGGCAGGGAGAAGAACAAG	59.93	2	0	
EDA4F	38	TGTA AACGACGGCCAGT AGATCGTGCCACTGAACTCC	59.75	7	3	342
EDA4R	38	CAGGAAACAGCTATGACCGCTCTCAGGATCACCCACTC	59.54	4	0	
EDA5F	39	TGTA AACGACGGCCAGT CCACTGAAGATGAAGGTCAGG	55.47	4	3	439
EDA5R	39	CAGGAAACAGCTATGACCGCAAGACACCCCTTCTTAGC	59.19	3	2	
EDA6F	39	TGTA AACGACGGCCAGT GGTCACATAGCTAGGAAGCGG	60.27	6	1	486
EDA6R	39	CAGGAAACAGCTATGACCCCTTTCAGCTCCGTCATCAGTG	59	4	3	
EDA7F	39	TGTA AACGACGGCCAGT CAGGCCTGGCAGCTGCTTTAC	64.17	8	2	497
EDA7R	39	CAGGAAACAGCTATGACCTGGCCCCCTCTCTTTCTC	63.01	4	0	
EDA8F	39	TGTA AACGACGGCCAGT GAACAATGCCTGTCACCTGTC	59.46	3	2	605
EDA8R	39	CAGGAAACAGCTATGACCAAGTCAAGCAGGCCTGTGCAC	61.09	6	3	
EDAR1F	39	TGTA AACGACGGCCAGT CCTCTAGATGGTGCAGGTGAG	59.59	6	1	376
EDAR1R	38	CAGGAAACAGCTATGACCTCTCGGCCACAGCTGAAGAG	61.88	6	1	
EDAR2F	41	TGTA AACGACGGCCAGT GGGGTTAAATAAAGGTAGCCAGA	57.88	4	0	250
EDAR2R	39	CAGGAAACAGCTATGACCGGACTATGATCAGCATTCCC	57.94	8	8	
EDAR3_4F	39	TGTA AACGACGGCCAGT TTGGGGTCTTGCAGGAGTCAC	62.27	6	3	1186
EDAR3_4R	37	CAGGAAACAGCTATGACCCCTTGCCGTAGCCCTCG	64.97	2	2	
EDAR5F	38	TGTA AACGACGGCCAGT GCTCTCTGCACCAGTCCCTG	62.52	4	3	229
EDAR5R	39	CAGGAAACAGCTATGACCACACCCTCTGTAGTGAAAGGG	59.02	4	3	
EDAR6F	38	TGTA AACGACGGCCAGT CTTTGAAGGTGGAGCTTCTC	56.06	6	4	212
EDAR6R	39	CAGGAAACAGCTATGACCCCTCTCCTTCTGAGCTTTC	57.47	4	0	
EDAR7-9F	38	TGTA AACGACGGCCAGT CCGGAGTCTGGAGGGAAGAC	61.32	5	1	768
EDAR7-9R	38	CAGGAAACAGCTATGACCTTCACTCGGCTGCACCCTGG	64.88	6	4	

Oligonucleótido	pb	Secuencia 5'-3'	Tm(°C)	AC	AC3'	TP(pb)
EDAR10F	39	TGTA AACGACGGCCAGTCCACAGGAGAACTTGTCAGGG	60.27	5	1	292
EDAR10R	37	CAGGAAACAGCTATGACCAGTCTTGCGGCTGTGAGGG	62.25	3	0	
EDAR11F	40	TGTA AACGACGGCCAGTGACATGGAGGATTTGCCTCCTT	60.36	6	6	225
EDAR11R	40	CAGGAAACAGCTATGACCAGTTCCTCCACAGGAGCCTCA	64.81	5	3	
EDAR12F	41	TGTA AACGACGGCCAGTGTTGACCTTCTATTGACTGTGAC	57.15	4	3	443
EDAR12R	38	CAGGAAACAGCTATGACCAGTCCAGAGCCCTCGTTGG	64.05	6	2	
EDARADD1AF	39	TGTA AACGACGGCCAGTGAAAGAACCACAAACCAAACC	56.08	1	0	456
EDARADD1AR	39	CAGGAAACAGCTATGACCCTGCCTTACACATAAGAACAG	56.18	3	1	
EDARADD1BF	36	TGTA AACGACGGCCAGTAGGTACCGAGGGACGCGC	64.15	6	4	374
EDARADD1BR	36	CAGGAAACAGCTATGACCAGCCCTCGATAGCCCTGCG	62.67	4	2	
EDARADD2F	39	TGTA AACGACGGCCAGTGATTACAGCATGAGCTACCTC	55.96	6	6	517
EDARADD2R	38	CAGGAAACAGCTATGACCAGGGAAGTGGGTAAAGCC	60.32	3	2	
EDARADD3F	39	TGTA AACGACGGCCAGTCCTTGATTCATTCTGTGCGA	55.97	4	4	353
EDARADD3R	42	CAGGAAACAGCTATGACCAGTACAGGCTAATCTATGGGCATG	61.38	4	4	
EDARADD4F	39	TGTA AACGACGGCCAGTATCCTTAAGAGCAGAGTTTGG	55.3	6	1	349
EDARADD4R	41	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTTTATGATCTAGAAATCCTG	52.48	6	2	
EDARADD5F	39	TGTA AACGACGGCCAGTGCGCTCAAGGTGCTCGTATTC	61.97	4	2	464
EDARADD5R	39	CAGGAAACAGCTATGACCCTACAGGCGCCACCACAACC	65.5	6	0	
EDARADD6AF	39	TGTA AACGACGGCCAGTAAAGAAAGAAACGAGCATTCT	54.04	4	4	388
EDARADD6AR	38	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTTCCGGAGCAAGAACTC	58.57	8	2	
EDARADD6BF	39	TGTA AACGACGGCCAGTCGTGTCACCCAACGGTGAAAA	61.61	6	4	406
EDARADD6BR	37	CAGGAAACAGCTATGACCCTCCACAAACTGCCAGC	59.34	5	3	

pb; pares de bases, AC; autocomplementareidad, AC3'; autocomplementareidad 3', TP tamaño del producto. En rojo se indica la secuencia sentido M13 y en verde la secuencia antisentido M13.



**Figura 11.** Descripción de los oligonucleótidos utilizados por el paquete de secuenciación *Big Dye direct Cycle sequencing*. (Modificado de BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit Protocol, AB).

La mezcla de reacción de PCR, por cada muestra de DNA a estudiar estuvo conformada de la siguiente manera:

Paquete comercial *Mix Fast* PCR 10µl

Oligonucleótido marcado sentido 0.5µl

Oligonucleótido marcado anti sentido 0.5µl

Agua 8µl

Muestra de DNA (100ng/µl) 1µl

Volumen total 20µl

Se procedió a realizar la reacción de PCR (Tabla 5).

**Tabla 5.** Programa de PCR de secuenciación

Proceso	Ciclos	Temperatura(°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96	5min
Desnaturalización		94	30s
Alineación de ON	35	62*	45s
Extensión		68	45s
Extensión final	1	72	2min
Pausa	1	4	-

ON: Oligonucleótidos \*La temperatura de alineación de ON varió de acuerdo al promedio de las Tm de los ON sentido y antisentido para cada exón.

## Secuenciación

Para la secuenciación del amplicón se utilizó el paquete comercial *BigDye Direct* (Applied Biosystems, Carlsbad, Cal., USA). La mezcla de reacción de secuenciación fue de la siguiente manera:

*BigDyeDirect* 2 $\mu$ l

Oligonucleótido sentido del fago M13 1 $\mu$ l

Amplicón de PCR 3-7 $\mu$ l

Agua cbp 13 $\mu$ l

Se utilizó el programa de secuenciación descrito en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Programa de secuenciación

Ciclos	Temperatura(°C)	Tiempo
1	37	15min
1	80	2min
	96	10s
25	50	5s
	60	4min
Pausa	4	-

Se purificó con el estuche *BigDye Xterminator* (Applied Biosystems, Carlsbad, Cal., USA) de acuerdo a instrucciones del proveedor. Posteriormente los productos se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador automatizado AB3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, Cal., USA). Se emplearon las secuencias de referencia NM\_001399.4 y NM\_022336.3 del c.DNA de *EDA* y *EDAR* respectivamente, contenidas en la base de datos del NCBI y el programa *Sequencher* v5.0 de Genecodes para el análisis de las secuencias.

## Resultados

El estudio de MLPA se realizó a los 18 pacientes incluidos en el protocolo, 17 pacientes masculinos y 1 paciente femenino.

En trece pacientes se identificaron mutaciones en *EDA* y solo en uno se observó una variación patogénica en *EDAR*. Todos los pacientes con mutaciones en *EDA* fueron del género masculino con un rango de edad entre los seis meses y los veinticuatro años de edad (Tabla 7). Los trece pacientes con variaciones en *EDA* presentaron cabello, cejas y pestañas escasas, así como la hipohidrosis propia de los afectados por la DEH. El vello corporal fue escaso en once pacientes, sin embargo, en los dos restantes esta característica no se pudo determinar debido a su edad temprana.

Se observó alteración de las piezas dentales en doce pacientes, en un paciente no se pudo determinar la agenesia dental por contar apenas con seis meses de edad. Dependiendo del número de piezas dentales ausentes se clasificó dicha característica como: anodoncia (ausencia de todas las piezas dentales) (paciente 3), hipodoncia (ausencia de hasta seis piezas dentales) y oligodoncia (ausencia de más de seis piezas dentales), siendo más frecuente esta última. Doce pacientes (92.30%) presentaron piel seca y pabellones auriculares en anteroposición; en nueve pacientes (69.23 %) hubo episodios febriles y ocho (61.53%) tuvieron frente abombada y solamente tres pacientes (23.07 %) presentaron dermatitis atópica. Las características fenotípicas de los pacientes con alteración en *EDA* se resumen en la (Tabla 7).

En relación al paciente con mutación en *EDAR*, tuvo oligodoncia y presentó las características antes mencionadas de la DEH excepto la piel seca y la dermatitis atópica. Los cuatro pacientes negativos para mutaciones en los genes estudiados cumplían con los síntomas clínicos clásicos de DEH.

**Tabla 7.** Datos clínicos de los pacientes masculinos con alteración en EDA.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Porcentaje (n=13)
Edad	6 m	6a	3 a	9 m	3 a	8 a	3 a	24 a	12 a	7 a	12 a	9 a	5 a	NA
EF	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	69.23%
DA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	23.07%
Cabello escaso	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Cejas escasas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
PE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Frente abombada	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	61.53%
Tipo de alteración dental	NA	O	O	A	O	O	O	O	O	O	O	H	H	NA
PAR	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92.30%
Hipohidrosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
Piel seca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	92.30%
VCE	NA	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%

DA: Dermatitis atópica; EF: Episodios febriles; NA: no aplica; PAR: Pabellones auriculares en anteroposición; PE: Pestañas escasas; VCE: vello corporal escaso; O: oligodoncia; A: anodoncia; H: hipodoncia.

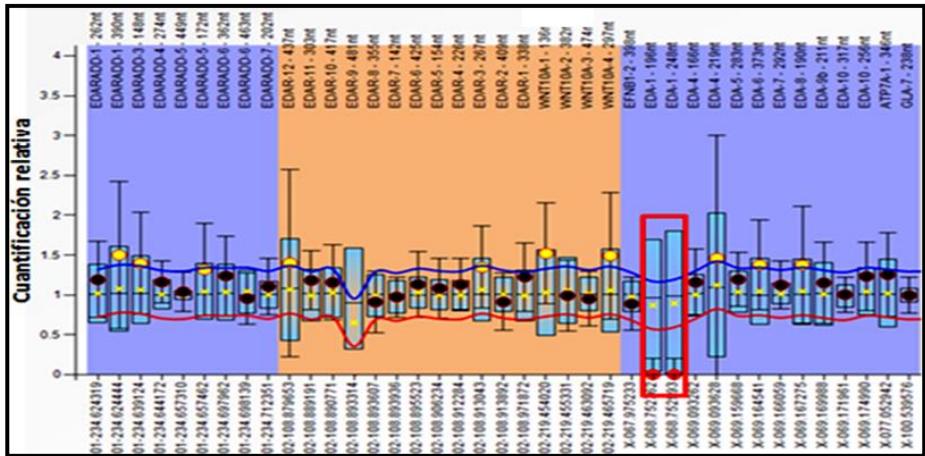
## Resultados moleculares

Se encontró sólo una alteración estructural por MLPA que consistió en una deleción del exón 1 de *EDA*, en el Paciente 1 (Tabla 8) (Figura 12). La PCR de punto final para los exones de *EDA* y el gen *SRY* como control interno para este paciente y su comparación con un control masculino, apoyaron el diagnóstico molecular de la deleción del exón 1 de *EDA* (Figura 13). Se corroboró el estado de portadoras de *EDA* ex1del en la mamá y la abuela del paciente 1 (Figura 14). Sin embargo, fenotípicamente la abuela materna presenta mayor afectación que la madre del paciente quien sólo presentaba signos leves de DEH, lo que hizo sospechar de un posible sesgo en la inactivación del cromosoma X. El estudio de ICX (HUMARA) confirmó un patrón sesgado en ambas pacientes (Tabla 9) (Figura 14).

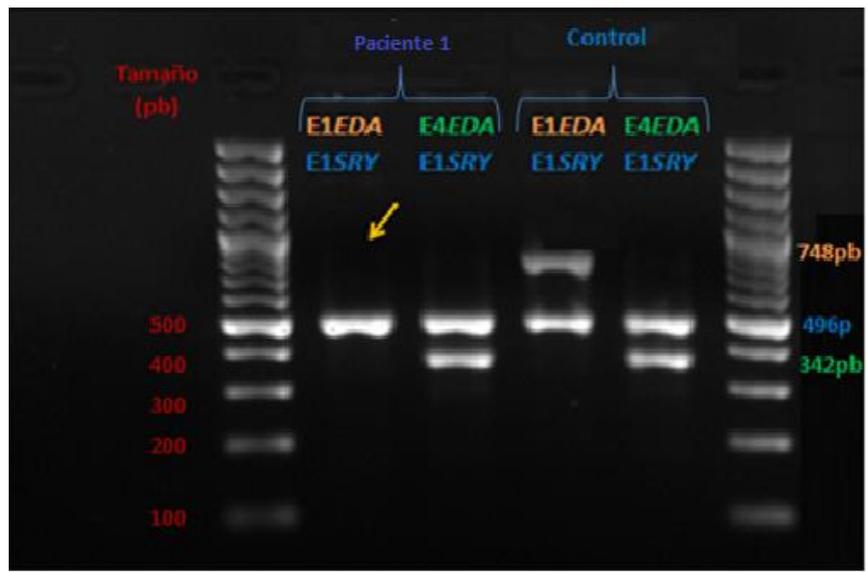
**Tabla 8.** Variaciones identificadas en los pacientes con DEH.

CASO	GEN	EXÓN	c.DNA	PROTEÍNA	dbSNP / REFERENCIA	PORTADORES	NO PORTADORES	rs3827760 p.V370A EDAR
1	EDA	1	-	-	Ex1del	Mamá/Abuela	-	CC
2	EDA	1	c.84_85InsC	p.G29fs*69	NR	Mamá	-	CC
3	EDA	1	c.161A>G	p.H54R	HM070091*	Mamá	-	CC
4	EDA	2	c.463C>T	p.R155C	rs132630312	-	-	CT
5	EDA	2	c.463C>T	p.R155C	rs132630312	Mamá	-	CT
6	EDA	2	c.463C>T	p.R155C	rs132630312	Mamá	-	CC
7	EDA	2	c.466C>T	p.R156C	rs132630313	Mamá/Tía/Tía	-	CC
8	EDA	2	c.467G>A	p.R156H	rs132630314	Mamá	Hermana	CC
9	EDA	7	c.918G>C	p.Q306H	CM034092*	Mamá	-	CT
10	EDA	8	c.1038G>C	p.C346W	Salas J et al 2015	Mamá**	-	CT
11§							-	CC
12	EDA	8	c.1069C>T	p.R357W	Arte S et al. 2013	Mamá	-	TT
13	EDA	8	c.1116C>G	p.N372K	NR	Mamá	-	CT
14	EDAR	12	c.1193-1194del TT	p.F398*	NR	-	Mamá Papá	CT
15	-	-	-	-	-	-	-	CC
16	-	-	-	-	-	-	-	CC
17	-	-	-	-	-	-	-	CC
18	-	-	-	-	-	-	-	CT

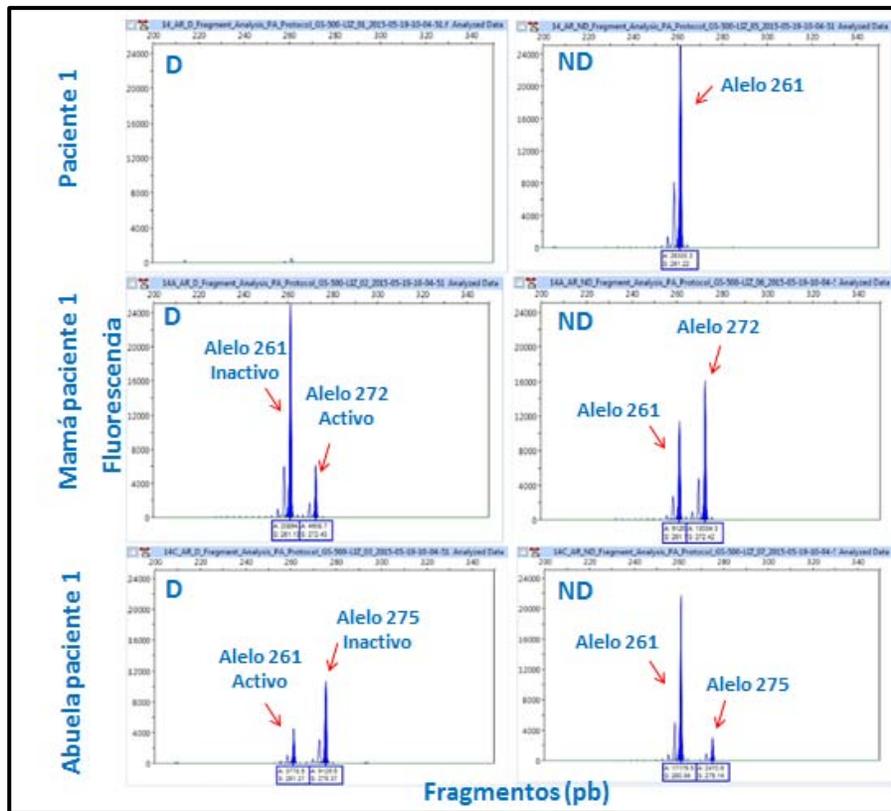
§Paciente con síndrome de Down. \*De acuerdo a la base de datos de mutaciones en genes humanos, HGMD. \*\*Se infirió por árbol genealógico. NR, no reportada.



**Figura 12.** Cuantificación relativa para los productos de las sondas de MLPA del paciente 1. Gráfico de los datos normalizados de MLPA, en el eje de las X se indica el exón de los genes analizados contra la cuantificación relativa. La caja roja señala la delección hemicigota para las dos sondas del exón 1 de *EDA* del paciente.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR dúplex de dos exones de *EDA* y de *SRY* en el paciente 1 y un control masculino (primeros dos carriles de la izquierda y de la derecha, respectivamente). En los extremos se ubican los marcadores de pesos moleculares de 100pb de Axygen. A la derecha se indican los tamaños de los amplicones: exón 1 y exón 4 de *EDA* (E1 y E4EDA) de 748pb y 342pb, respectivamente; y exón 1 de *SRY* (E1SRY) de 496pb. La flecha señala la ausencia de amplificación del exón 1 de *EDA* en el paciente.

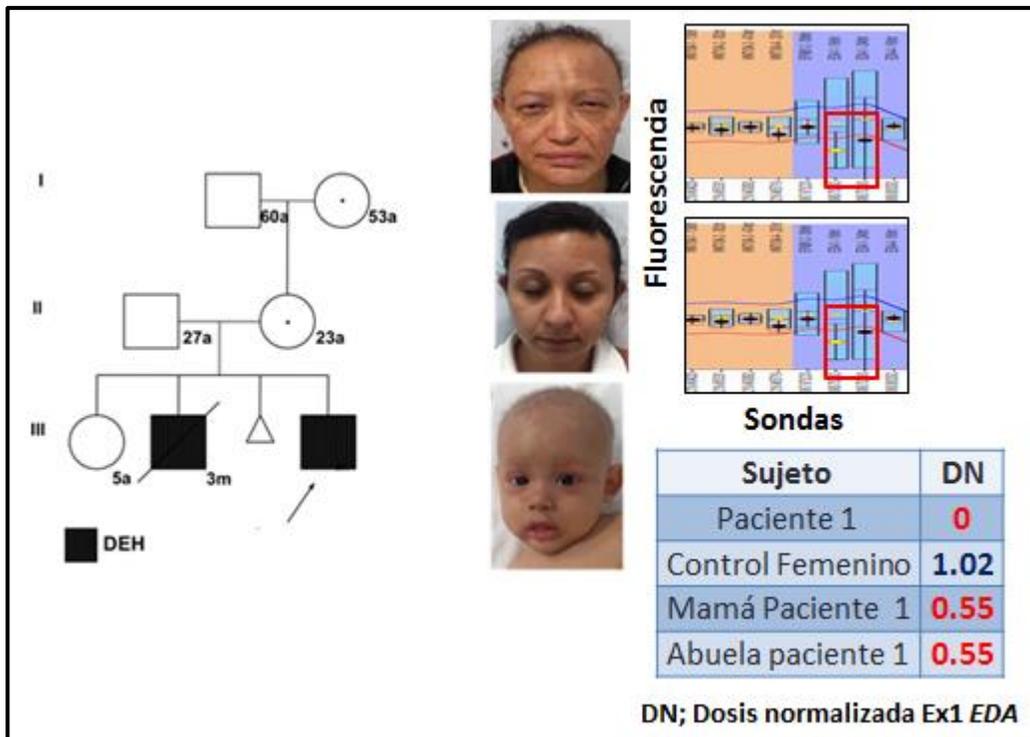


**Figura 14.** Gráficos obtenidos del análisis de fragmentos del ensayo HUMARA para el estudio de ICX para el caso 1. Eje de las X indica el tamaño del fragmento en pares de bases (pb) y en las ordenadas, la emisión de fluorescencia. Se observa el alelo que tiene la deleción (alelo de 261 pb) con un patrón de inactivación diferente para la mamá y la abuela. D: digerido; ND: no digerido.

**Tabla 9.** Cálculo de la proporción de activación/inactivación para el cromosoma X del caso 1 y las portadoras.

Muestra/(alelos)	Digerido		No Digerido		FC	CP2	CT	A1Xi%	A2Xi%	Conclusión
	A1 área	A2 área	A1 área	A2 área						
Paciente 1 (261)	-	--	-	-	-	-	-	-	-	-
Mamá paciente 1 (261,272)	20894	4909	9126	13034	0.7002	3437	24331	86	14	Se inactiva más el alelo de 261pb
Abuela Materna Paciente 1 (261,275)	3778	9130	17180	2471	6.9527	63478	67256	6	94	Se inactiva más el alelo de 275pb

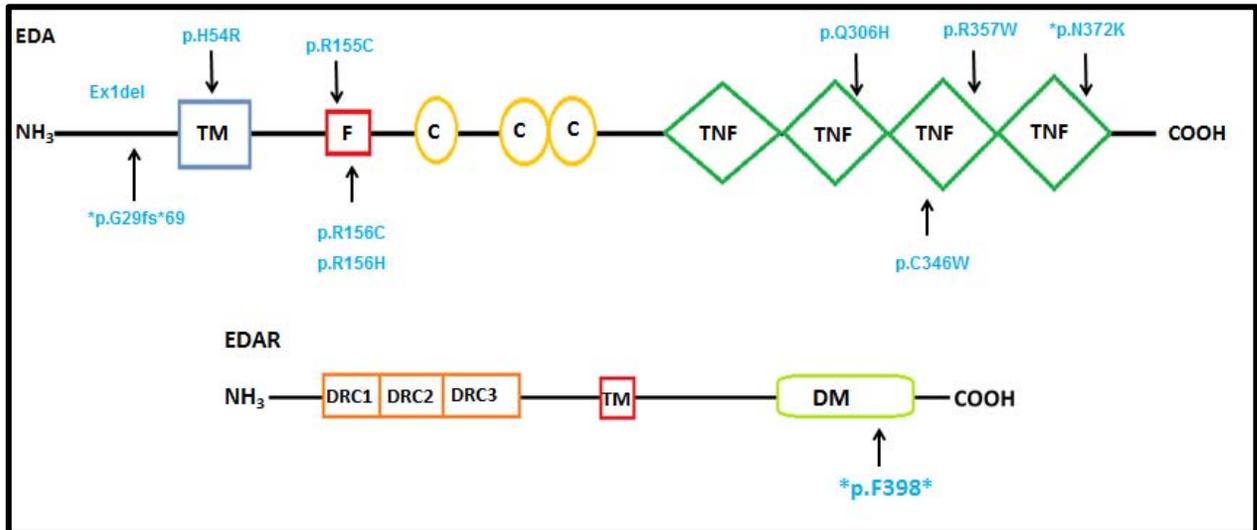
FC: factor de corrección; CP2: área corregida del pico 2; CT: corrección total; A1Xi: inactivación porcentual del alelo 1; A2Xi: Inactivación porcentual del alelo 2. A1: 261 pb; A2: 272 pb-mamá, 275 pb-abuela.



**Figura 15.** Genealogía del paciente 1. Se indica el estado de portadora de la mamá y la abuela, el resultado de MLPA para ambas pacientes y una tabla con los valores de dosis obtenido.

En aquellos casos negativos para MLPA se procedió a la secuenciación exónica de los tres principales genes asociados a DEH (*EDA*, *EDAR* y *EDARADD*) para identificar variaciones en la secuencia de estos genes, así como también se analizaron las uniones intrón-exón por posibles variaciones que pudieran afectar el corte-empalme. En la Tabla 8 se resumen las variaciones encontradas en los pacientes con DEH incluidos en el estudio.

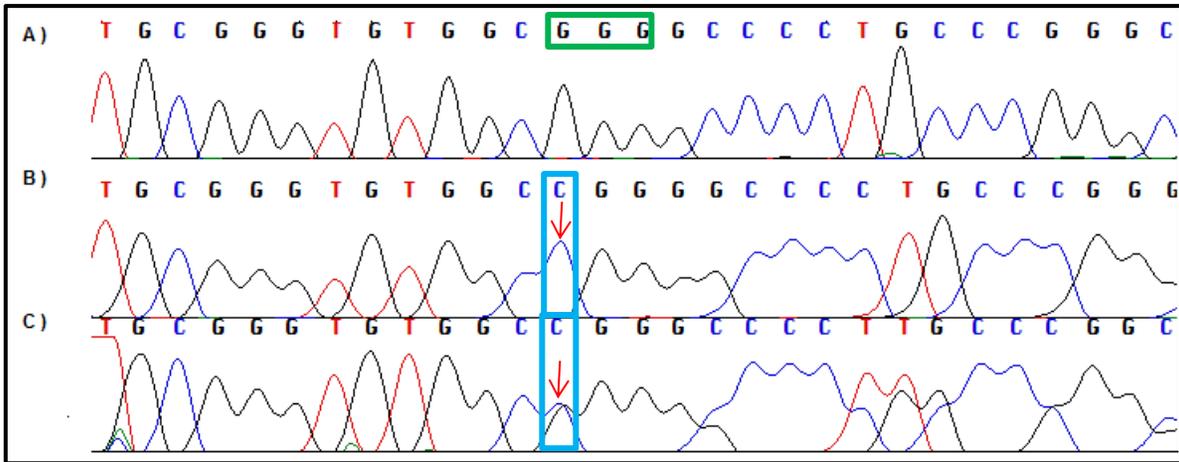
Se identificaron nueve variaciones distintas en *EDA* por secuenciación (Figura 16) en doce pacientes pertenecientes a once familias.



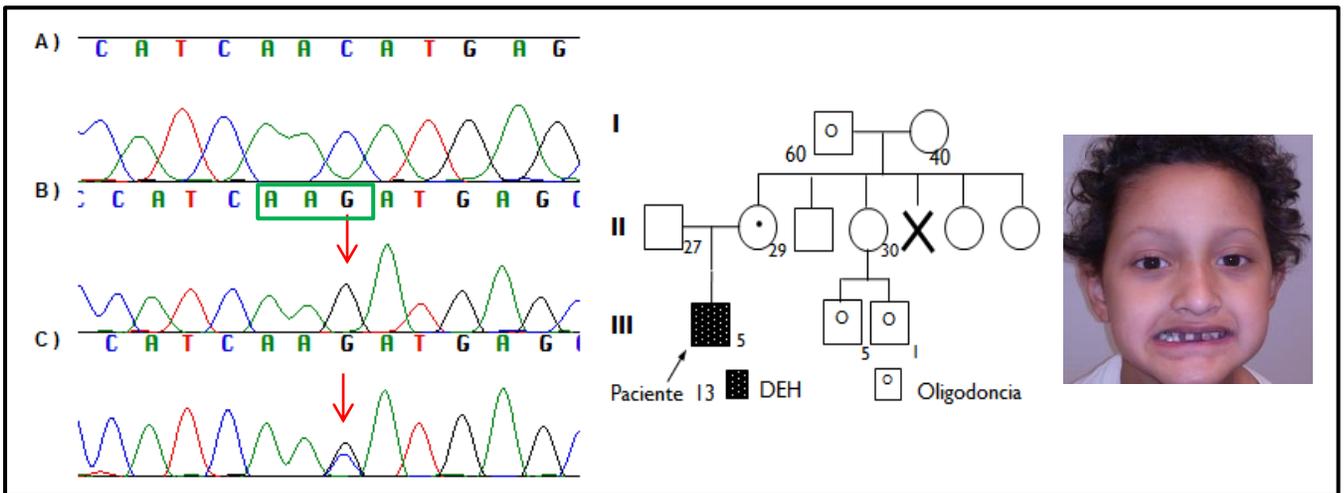
**Figura 16.** Esquema de EDA y EDAR. Se muestran las mutaciones identificadas en los pacientes con DEH en este estudio y el dominio funcional donde se localizan. TM. Transmembrana, F. Sitio de corte por furina, C. Dominio de colágeno, TNF. Dominio de homología a TNF, DRC1. Dominio rico en cisteína 1, DRC2. Dominio rico en cisteína 2, DRC3. Dominio rico en cisteína 3, DM. Dominio de muerte. \*Variaciones no reportadas.

Dos de estas mutaciones no se han reportado previamente: una corresponde a un corrimiento del marco de lectura con codón de paro prematuro (c.84\_85InsC; p.G29fs\*69) en el paciente 2 que presentó AHF en tíos maternos (Figura 17) y una de sentido equivocado (c.1116C>G; p.N372K) en el paciente 13.

Para esta segunda mutación se tamizaron cincuenta controles femeninos que corresponden a 100 alelos y no se identificó esta variación en ninguno de ellos (Figura 18).

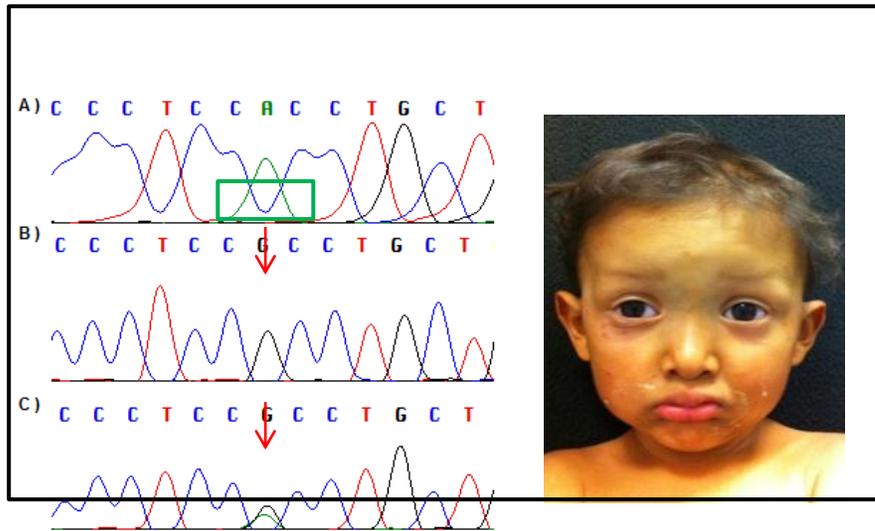


**Figura 17.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón1-EDA de un control (A), del paciente 2 (B) y de la mamá del paciente 2 (C) donde la flecha roja señala la mutación c.84\_85InsC en estado hemigigoto en el paciente 2 y en estado heterocigoto en la mamá del paciente 2, la caja azul señala el sitio donde se inserta una citosina y la caja verde indica el codón afectado.



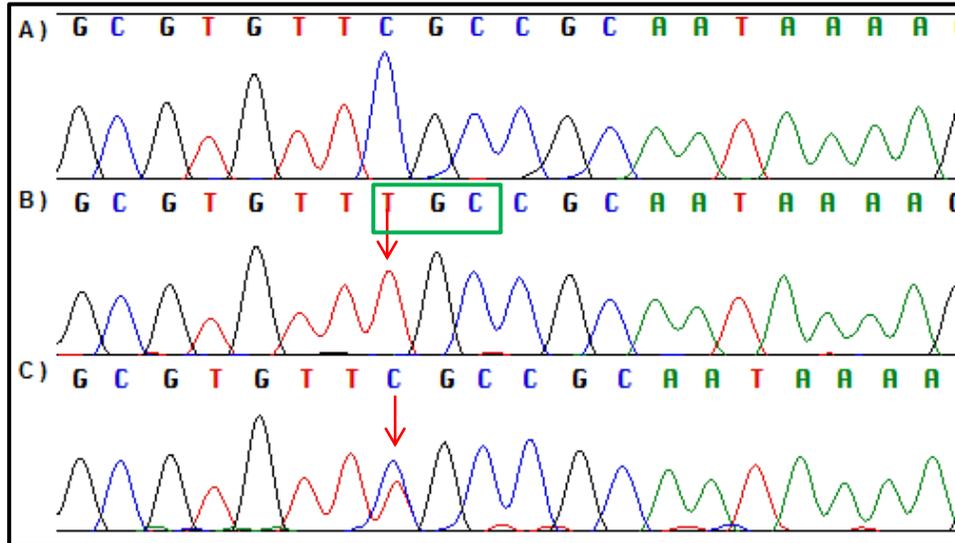
**Figura 18.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 8 de EDA para un control (A), para el paciente 13 (B) y su mamá (C). Las flechas señalan el sitio de la mutación c.1116C>G y la caja verde indica el cambio del codón (p.N372K), árbol genealógico del paciente 13 en el cual se indican los AHF de oligodondia.

También en el exón 1 de EDA se identificó una variación de sentido equivocado previamente reportada en el paciente 3 (HM070091; c.161A>G; p.H54R). Este paciente no reportó antecedentes heredofamiliares de DEH, pero el estudio molecular identificó a la mamá como portadora de la mutación (Figura 19).



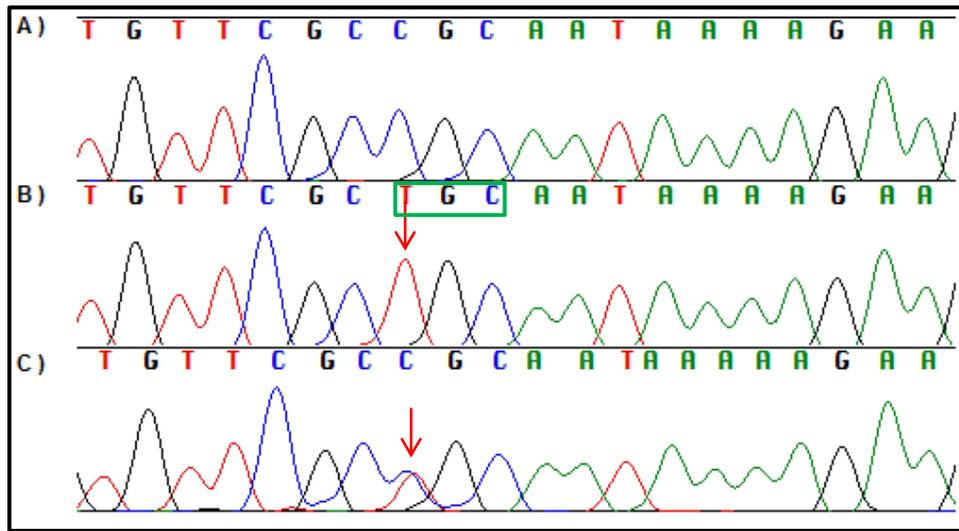
**Figura 19.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 1 de *EDA* para un control (A), para el paciente 3 (B) y su mamá (C). Las flechas indican el sitio de la mutación c.161 A>G y las caja verde indica el cambio de codón (p.H54R).

Se identificó una mutación recurrente en el exón 2 de *EDA* en tres pacientes (pacientes 4-6) no relacionados. La variación (c.463C>T; p.R155C) también ha sido previamente reportada (rs13260312) (Figura 20).

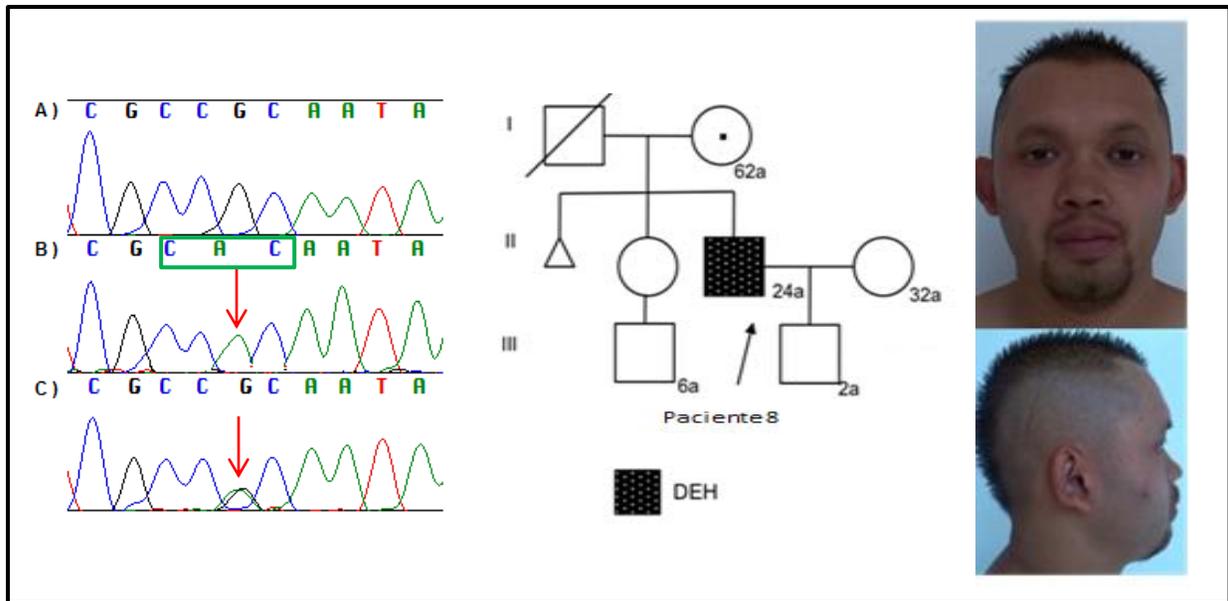


**Figura 20.** Electroferograma parcial del exón 2 de *EDA* representativo de un control (A) de los pacientes 4-6 (B) y de las mamás de los pacientes 5 y 6 (C), en quienes se identificó la mutación hemicigota c.463 C>T; p.R155C, la flecha roja indica el sitio donde ocurrió la mutación y la caja verde el codón afectado.

Adyacentes a la mutación recurrente se identificaron dos mutaciones distintas que afectan el mismo codón en los pacientes 7 y 8. En el paciente 7 se identificó la mutación hemicigota (c.466 C>T; p.R156C) (Figura 21). Este paciente tenía antecedentes heredo-familiares de DEH por lo que se incluyeron en el estudio a dos tías maternas que resultaron ser portadoras de la variación. En el paciente 8 se observó la mutación (c.467G>A; p.R156H) (Figura 22); por historia clínica no se reportaron antecedentes heredo-familiares; sin embargo, la mamá resultó ser portadora de la variación. También se incluyó a la hermana del paciente 8 y el resultado del estudio molecular fue negativo.

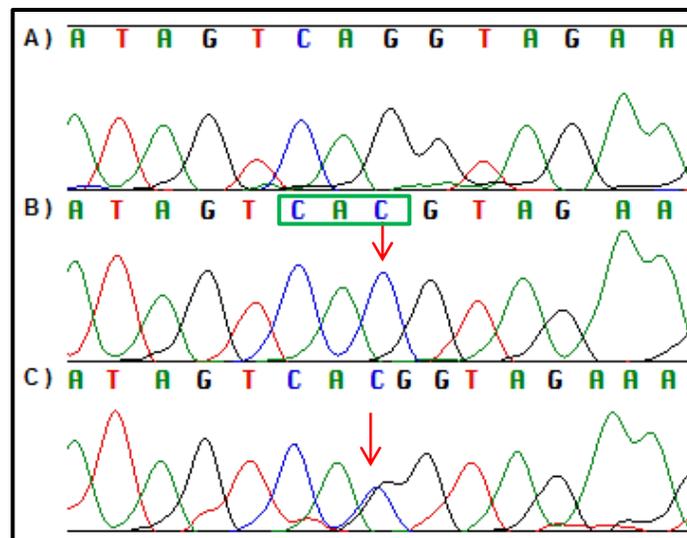


**Figura 21.** Electroferograma parcial del exón 2 de *EDA* de un control (A), del paciente 7 (B) y de la mamá del paciente 7 (C). Se identificó la mutación c.466 C>T; p.R156C (rs132630313). Las flechas rojas indican el sitio de la mutación y la caja verde el codón afectado.



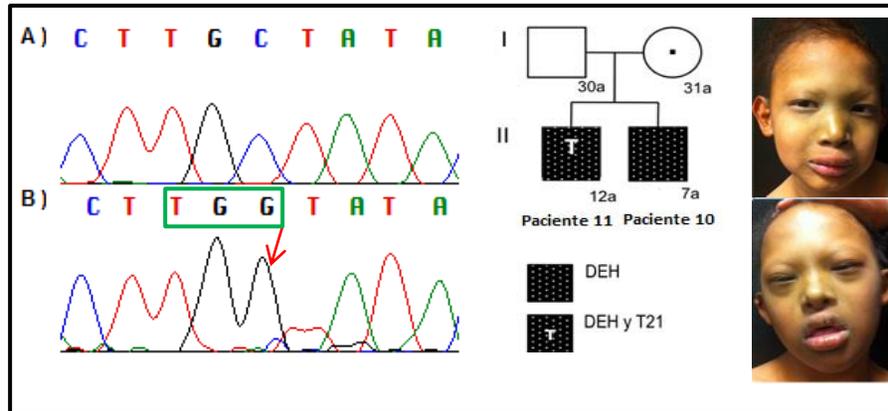
**Figura 22.** Secuencia parcial del exón 2 de *EDA* de un control (A), del paciente 8 (B) y su mamá (C). Las flechas señalan el sitio de la mutación c.467G>A y las caja verde indica el cambio del codón 156, p.R156H.

En el paciente 9 se identificó la mutación (c.918G>C; p.Q306H) previamente reportada (Tabla 8). Dicho paciente no presentó antecedentes heredofamiliares pero el análisis molecular corroboró el estado de portadora de la mamá (Figura 23).



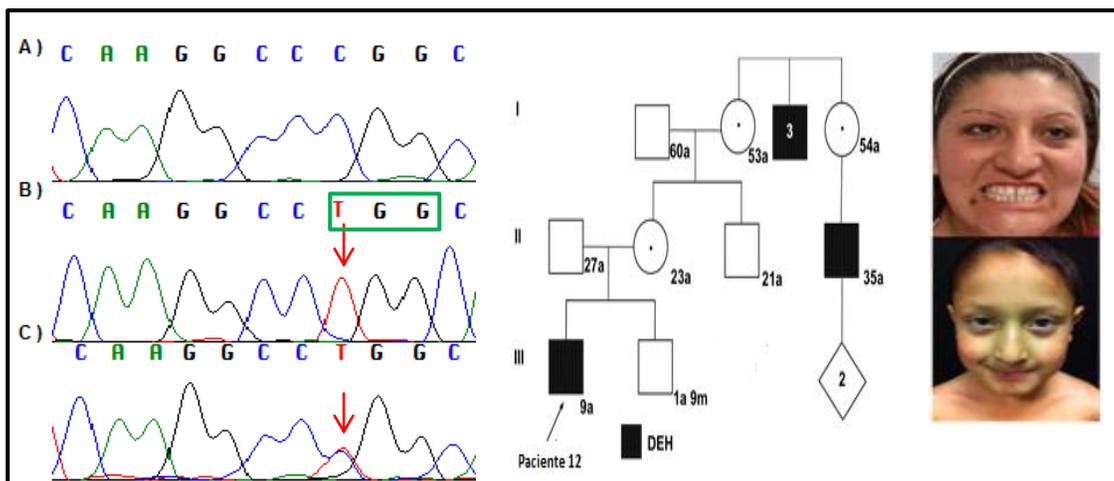
**Figura 23.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *EDA* de un control (A), del paciente 9 (B) y su mamá (C). Las flechas indican el sitio de la mutación c.918G>C y la caja verde indica el cambio de codón p.Q306H.

El análisis del caso familiar con dos hermanos afectados (pacientes 10 y 11) identificó una mutación en el exón 8 de *EDA*: c.1038 G>C, p.C346W (Figura 24) (Tabla 8).



**Figura 24.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 8 de *EDA* representativo de un control (A) y de los pacientes 10-11 (B). Las flechas señalan el sitio de la mutación c.1038 G>C y la caja verde indica el cambio del codón 346 (p.C346W).

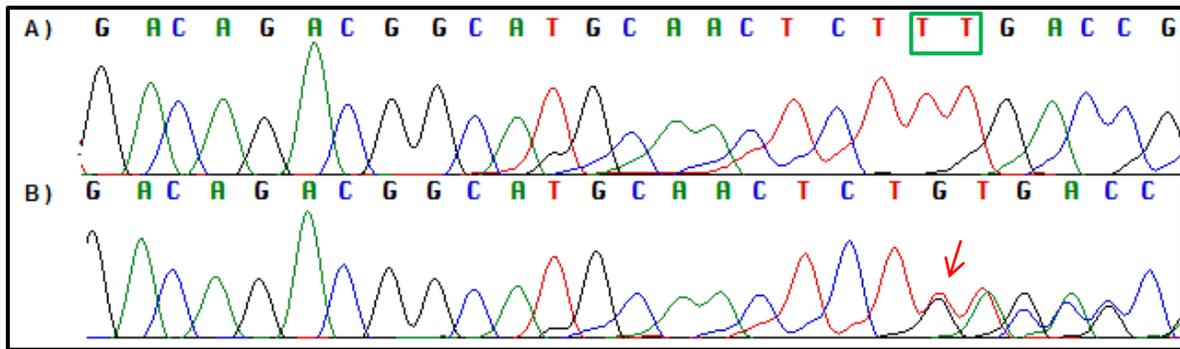
En el paciente 12 se encontró la variación (c.1069 C>T; p.R357W) previamente reportada (Tabla 8). Se reportaron tíos maternos afectados. El estudio molecular de la mamá resultó positivo (Figura 25).



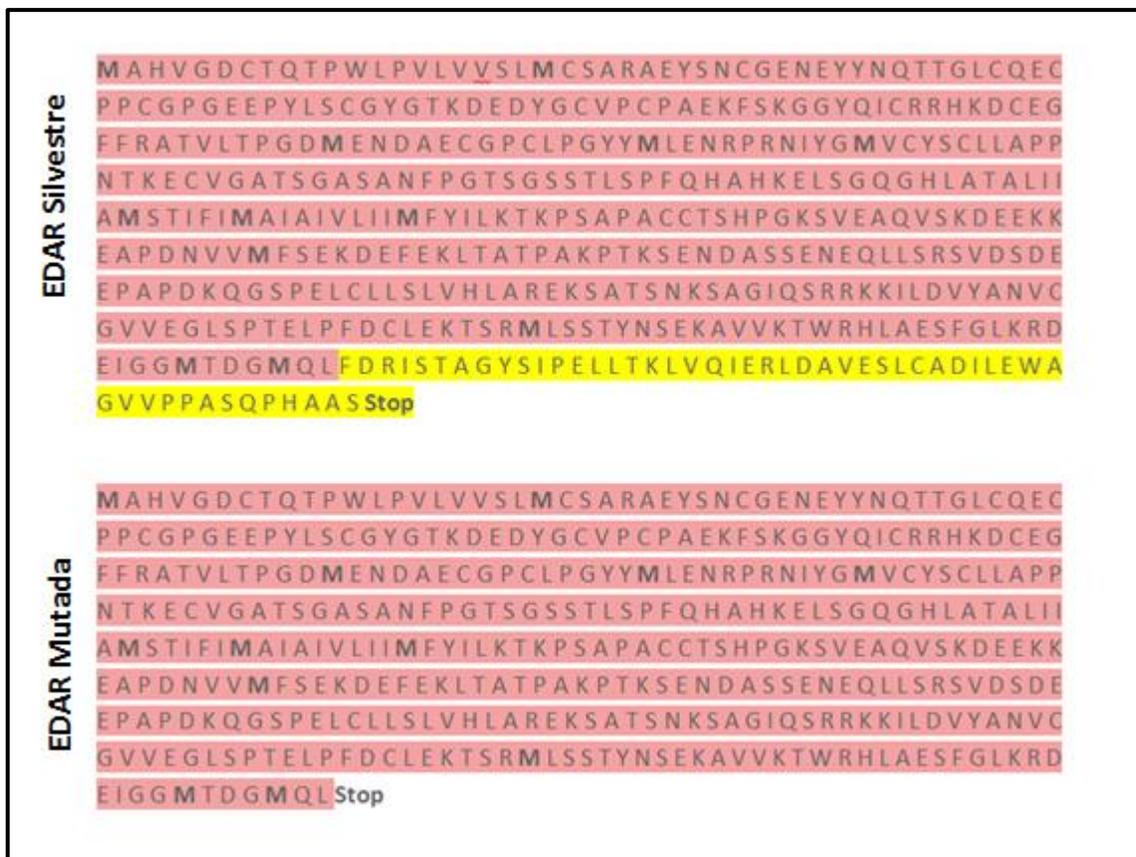
**Figura 25.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 8 de *EDA* de un control (A) del paciente 12 (B) y su mamá (C). Las flechas señalan el sitio de la mutación c.1069 C>T y la caja verde indica el cambio de codón 357 (p.R357W).

El análisis molecular de todas las madres estudiadas de los pacientes con mutaciones puntuales en *EDA* (9/11) demostró que 81.8% son portadoras de la mutación. En el caso de la madre de los pacientes 10 y 11 se infirió el estado de portadora obligada por árbol genealógico y a la del paciente 4 no fue posible estudiarla (Tabla 8).

En el paciente 14 se identificó una mutación *de novo* en *EDAR*, que consistió en la delección de 2 timinas en el exón 12 (c.1193-1194 del TT). Esta mutación modifica el codón 398 de la proteína originando un codón de paro, truncando la proteína en 397 residuos y perdiendo 51 aminoácidos (Figura 27). Esta mutación no ha sido descrita previamente (Tabla 8 y Figura 26).



**Figura 26.** Electroferograma de la secuencia parcial del exón 12 de *EDAR* de un control (A) y del paciente 14 (B), encerrado en un rectángulo se muestra las dos timinas afectadas y la flecha roja indica la mutación c.1193-1194 del TT; p.F398\*.



**Figura 27.** Secuencia de EDAR silvestre y EDAR mutada. En amarillo se resaltan los 51 aminoácidos que se pierden a causa de la mutación p.F398\*.

En cuatro pacientes con DEH, incluyendo una paciente femenina, no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados.

El polimorfismo rs3827760 (T>C) del exón 12 de *EDAR* fue investigado en los 18 pacientes con DEH, encontrándose que 10 pacientes fueron homocigotos CC, 7 CT y sólo uno homocigoto para el alelo común (Tabla 8).

## Discusión

Todos los pacientes incluidos en el protocolo presentaban en su fenotipo la triada clásica de la enfermedad y otras manifestaciones que confirmaban el diagnóstico clínico. De los pacientes con alteración en *EDA*, la agenesia dental y el escaso vello corporal no se pudo evaluar en el paciente 1 quien cuenta con seis meses de edad y aún no ha desarrollado su dentición primaria. Sin embargo, se espera que al ir creciendo se pueda observar la agenesia característica de la DEH. En el paciente cuatro tampoco se pudo observar el escaso vello corporal debido a su edad temprana (Tabla 7).

Reyes-Chicuellar N et al., 2010 describieron un grupo de veinte pacientes con diagnóstico clínico de DEH en Akil, una comunidad rural de 6978 habitantes en Yucatán México, encontrando una prevalencia de la enfermedad del 0.28%, una prevalencia más alta de lo esperada para cualquier población tomando como referencia la prevalencia a nivel mundial, probablemente debido a la endogamia en dicha población. Los pacientes de Akil presentaron varias características clásicas de la DEH como bajo peso, hipertermia, nariz plana y sudoración disminuida o ausente.

Las alteraciones dentales observadas en este grupo de pacientes incluían la hipodoncia, dientes cónicos, desmineralización del esmalte con tendencia a la formación de caries, la agenesia dental afectó principalmente a los segundos molares, a los incisivos laterales maxilares y a los incisivos centrales y laterales mandibulares. Ocho pacientes mayores de veinte años presentaron anodoncia con una función reducida de la masticación. En nuestro grupo solo hubo un paciente mayor de veinte años y solo uno menor de veinte años presentó anodoncia, lo que resalta la importancia de realizar un diagnóstico oportuno para corregir las piezas dentales y evitar secuelas en la masticación que pueden ocasionar la desnutrición del paciente y problemas del habla. La hipotricosis abarcó alopecia parcial o total con cabello delgado, corto, frágil e hipo pigmentado. Tuvieron cabello corporal y facial escaso con cejas y pestañas escasas y la piel seca se presentó en el 100% de su grupo de estudio. Al igual que nuestro grupo de paceutes, la dermatitis atópica y los episodios febriles fueron menos frecuentes. En 2015 Pozo- Molina reportó el cambio c.409T>C; p.Leu56Pro en el exón uno de *EDA* como causante de la DEH en una familia de la comunidad Akil (Pozo-Molina G et al., 2015).

Guazzarotti L et al., 2015 analizó un grupo de 45 pacientes italianos con DEHLX y encontró que el 97.5% de los pacientes tenía agenesia dental siendo más frecuente la oligodoncia (84.6%) y menos frecuente la anodoncia (6%). La mayoría de los pacientes presentó sudoración disminuida (86.7 %). El 93.3% de los pacientes tuvo alteraciones del cabello de las cuales 17.8% era alopecia total y 76.5% alopecia parcial. El 62.2% de los pacientes presentó alteraciones severas de la piel, 35.6% de los pacientes alteraciones moderadas y solo un paciente no presentó alteraciones dermatológicas, observándose la misma tendencia que en nuestro grupo de pacientes, lo que indica un espectro fenotípico de la DEH similar, independiente de la población de procedencia.

De acuerdo con la literatura, 55-60% de los casos con diagnóstico clínico de DEH se explican por variaciones en *EDA*, mientras que las mutaciones en *EDAR* y *EDARADD* explican 15-20% y 1-2% de los casos totales, respectivamente (Wright TJ et al 2014).

Nuestro grupo de estudio estuvo conformado por dieciocho pacientes (17 masculinos y 1 femenino), dos pacientes masculinos son hermanos, por lo que tenemos un total de 17 familias analizadas. En 12 casos se identificaron variaciones en *EDA* (12/17, 70.58%); solo en un caso se observó mutación en *EDAR* (1/17, 5.88%) y no se identificó ninguna alteración en *EDARADD*. La frecuencia de mutaciones en la muestra de pacientes analizada fue similar a lo reportado; siendo más frecuentes las alteraciones en *EDA*, seguidas por las variaciones en *EDAR* y por último, las mutaciones en *EDARADD*.

Aunque en nuestra serie de casos no analizamos la secuencia de *WNT10A*, las mutaciones en este gen causan un amplio espectro de displasias ectodérmicas, que van desde signos leves de displasia ectodérmica como hipodoncia hasta displasia odonto-onico-dérmica y síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge (Krøigård AB et al., 2016), características que incluyen hiperqueratosis e hiperhidrosis palmo-plantar que no se observaron en la muestra de pacientes estudiada.

Aproximadamente el 95% de los pacientes masculinos con DEHLX tienen variaciones patogénicas en *EDA*, de los cuales hasta el 12% de dichos pacientes pueden presentar deleciones que abarcan uno o más exones de *EDA* (Kere J et al., 1996). La detección de deleciones o duplicaciones de uno o varios exones de un determinado *loci* por MLPA tiene una precisión del 98% (tomado de <http://personalizedmedicine.partners.org/Laboratory-For-Molecular-Medicine/Tests/Ectodermal-Dysplasia/EDA-Deletion-Duplication.aspx>), lo cual proporciona resultados confiables en nuestro estudio.

El análisis de dosis génica mediante MLPA en todos los pacientes permitió identificar una alteración estructural del exón 1-*EDA* en un caso.

En nuestra serie de casos masculinos con alteración en *EDA* hubo mayor prevalencia de las variaciones de secuencia (11/12, 91.3%) con respecto a las estructurales (1/12; 8.33%). La frecuencia de alteraciones estructurales que identificamos en *EDA* es un poco menor a lo documentado (8.33% vs 12.00%).

El análisis por MLPA se ha utilizado por otros grupos en pacientes con DEH y la pérdida del exón 1 del gen *EDA* es la alteración que principalmente se ha identificado (Lexner MO et al 2008). La delección del exón uno se describió por Kere J (1996) y más tarde por Pääkkönen K (2001) quien describe un paciente masculino con delección del exón 1 completo, confirmado por *Southern blot*, sin mayor información clínica. Kere J (1996) también reportó un caso con delección de los exones 1-2 en *EDA*, mientras que documentó un caso femenino con delección del exón 1 y otro caso masculino con eliminación de los exones 1-3 mediante MLPA. El análisis de marcadores polimórficos demostró que la paciente era hemicigota para los microsatélites flanqueantes DXS106 y DXS1690, su madre también presentaba la alteración, pero los autores no identificaron correlación genotipo-fenotipo. Del segundo caso con pérdida de los exones 1-3 sólo se predice la terminación temprana de la traducción de *EDA* (Lexner MO et al 2008).

En las bases de datos públicas (HGMD, LOVD) se han documentado delecciones en el exón 1 de *EDA*, pero al igual que en el paciente 1, no se han delimitado de manera precisa los puntos de escisión. En la PCR de punto final y en el MLPA observamos amplificación del exón 2 en nuestro paciente, pero desconocemos si la delección afecta la región promotora, el inicio de la transcripción o si abarca el exón 1 completo. Suponemos que la eliminación hacia el extremo 3' se extiende hasta parte del intrón 1-2 debido a su gran tamaño (340,322 pb). En la cepa *Tabby* del ratón, en la cual está ausente el exón 1 de *Eda*, la alteración evita la transcripción de cualquier mRNA funcional (Srivastava AK. et al., 1999). El paciente 1 con la pérdida del exón 1-*EDA* tiene el antecedente de un hermano finado a los tres meses de edad por probable complicación asociada a DEH. El fenotipo del paciente corresponde a una forma clásica. Debido a su edad de 6 meses, aún no presenta dentición, sin embargo y basados en los pacientes descritos con esta alteración estructural, así como el modelo del ratón *Tabby* esperaríamos oligodoncia (Sadier A. et al., 2014).

El estudio por MLPA permite la cuantificación relativa de un determinado número de secuencias y ha sido aplicado con éxito en la detección de CNV en varios genes (Schouten

JP et al., 2002). El análisis molecular por MLPA detectó la deleción heterocigota del exón 1 de *EDA* en la mamá y la abuela del paciente 1 lo que sugiere que el estudio por MLPA o de otro método cuantitativo debe ser incluido en el análisis mutacional en casos con sospecha clínica de DEHLX para la identificación de mujeres portadoras (Lexner MO et al 2008).

En la clínica se apreciaron diferencias en la severidad del fenotipo de DEH de ambas portadoras de la delEx1 *EDA*. El fenotipo más severo se observó en la abuela en comparación con manifestaciones leves en la mamá del paciente 1. Por lo anterior, se decidió estudiar el patrón de inactivación del cromosoma X (ICX) en ambas mujeres. En las dos mujeres estudiadas, se identificó un sesgo en la ICX en células mononucleares de sangre periférica: en la mamá se encontró más activo el alelo normal, mientras que en la abuela el alelo mutado fue el más activo.

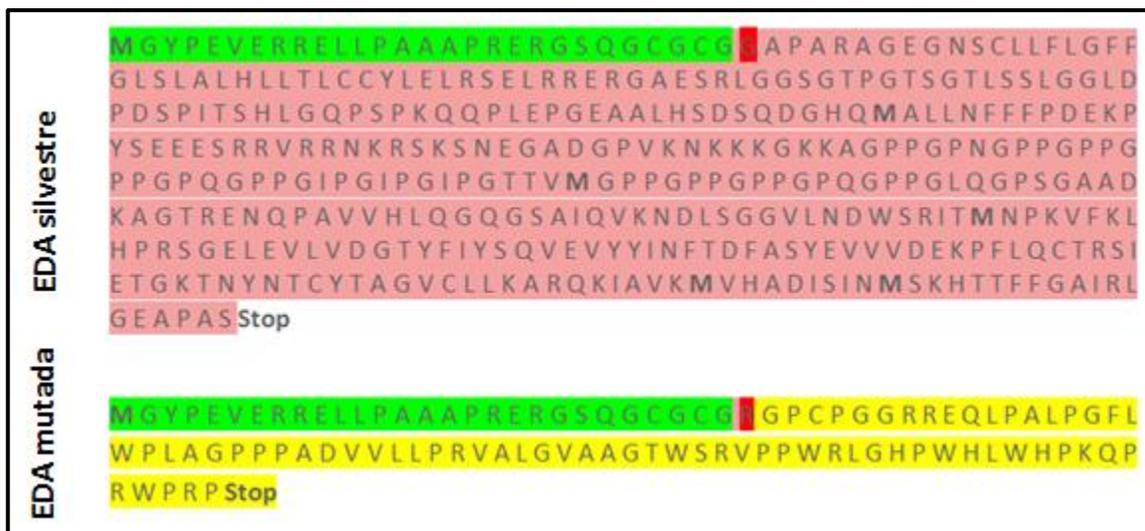
Debido a la variabilidad fenotípica presente en mujeres portadoras de mutaciones en *EDA* y a la presencia de ICX en portadoras de mutaciones causantes de otras enfermedades recesivas ligadas al X, Lexner MO et al., (2008) estudiaron el patrón de ICX en portadoras de alteraciones en *EDA* y en un grupo control. Este grupo estudió dos tejidos diferentes: sangre periférica y mucosa oral y encontraron que el patrón de ICX se correlacionaba en ambos tejidos, pero no halló correlación entre el patrón ICX y la edad. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre el patrón ICX entre las portadoras y el grupo control; sin embargo, sí observó una tendencia a una mayor inactivación del X con el alelo normal en mujeres portadoras de mutaciones en *EDA* con fenotipo severo (Lexner MO et al., 2008).

Ørstavik KH et al., (2007) reportaron un caso de una niña con fenotipo severo de DEHLX causado por la inserción de un fragmento del cromosoma X que incluye a *Xist* e interrumpe a *EDA* y que además presenta un sesgo completo en la ICX. El cromosoma X paterno era el único activo en células de sangre periférica. La ausencia de *Xist* en el cromosoma en el que se interrumpe *EDA*, explicó el sesgo en la inactivación de esta paciente; debido a la cercanía de *EDA* con *Xist*, es posible que algunas alteraciones estructurales como las deleciones afecten a ambos genes y expliquen algunos casos con sesgo en la inactivación del X.

En nuestro caso no identificamos los puntos de ruptura de la deleción, sin embargo, es poco probable que incluya a *XIST*, ya que si bien observamos sesgo en la ICX; existen diferencias en el origen parental del cromosoma activo en ambas portadoras. El grupo de Martínez F et al., (1998) observó sesgo en la ICX con diferente origen parental de CX preferentemente inactivado en dos portadoras de una mutación de sentido equivocado en *EDA* (p.L55R) con variabilidad fenotípica de DEH, lo que parece apoyar la idea de que el proceso de ICX participa en la variabilidad del cuadro clínico de DEH en algunos casos con mujeres

portadoras de variaciones en *EDA*. Las diferencias en la severidad de mujeres portadoras de alteraciones en *EDA* también pueden ser resultado de una penetrancia incompleta y de expresividad variable, ambas resultado de la influencia de otros genes y de factores ambientales sobre el fenotipo.

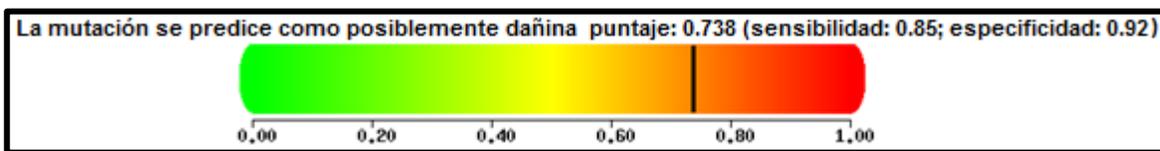
Los ocho exones de *EDA* se secuenciaron en los 17 pacientes restantes. La secuenciación de Sanger identificó mutaciones en 12 casos, pertenecientes a 11 familias (Tabla 8). La mayoría de las mutaciones encontradas ya han sido reportadas y afectan principalmente los exones 2 y 8. Dos mutaciones no se encontraron en las bases de datos o reportes previos: p.N372K en el paciente 13 y p.G29fs\*69 en el paciente 2.



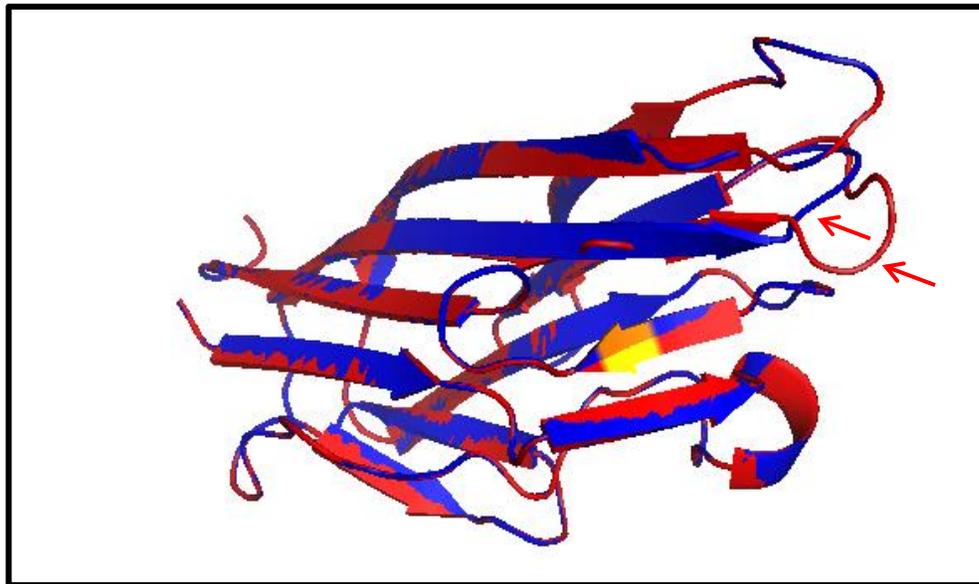
**Figura 28.** Análisis de predicción de la mutación c.84\_85InsC; p.G29fs\*69 en la proteína *EDA*. La secuencia superior corresponde a la proteína silvestre (391aa) y la inferior a *EDA* mutante (98aa). En color rojo se indica el residuo afectado y en amarillo el corrimiento del marco de lectura con el codón de término prematuro (*Stop*), de acuerdo a la herramienta *ExPASy translate*.

El análisis de la mutación del paciente 2 (c.84\_85InsC; p.G29fs\*69) en *EDA* con la herramienta informática *ExPASy translate* indicó que la inserción de la citosina corre el marco de lectura a partir del residuo veintinueve de *EDA* y trunca la proteína en 98 residuos (Figura 28). Esta alteración tiene efecto predictivo de terminación temprana de la traducción, lo que resultaría en una proteína trunca o en ausencia total de la proteína debido al decaimiento de mRNA mediado por codón de término prematuro (Hug N et al., 2016).

La variante nueva de sentido equivocado c.1116 C>G; p.N372 en el paciente 13, no se encontró en 50 controles de género femenino (100 cromosomas X) lo que sugiere su asociación con la DEH. El análisis *in silico* de esta alteración con *PolyPhen* dió un valor predictivo de patogenicidad de 0.738 a nivel de secuencia nucleotídica (Figura 29). Además, el análisis estructural de la proteína mutada con *PyMol viewer* indicó una alteración en la estructura de EDA, la cual es relevante para la especificidad de la interacción con su receptor (Figura 30).



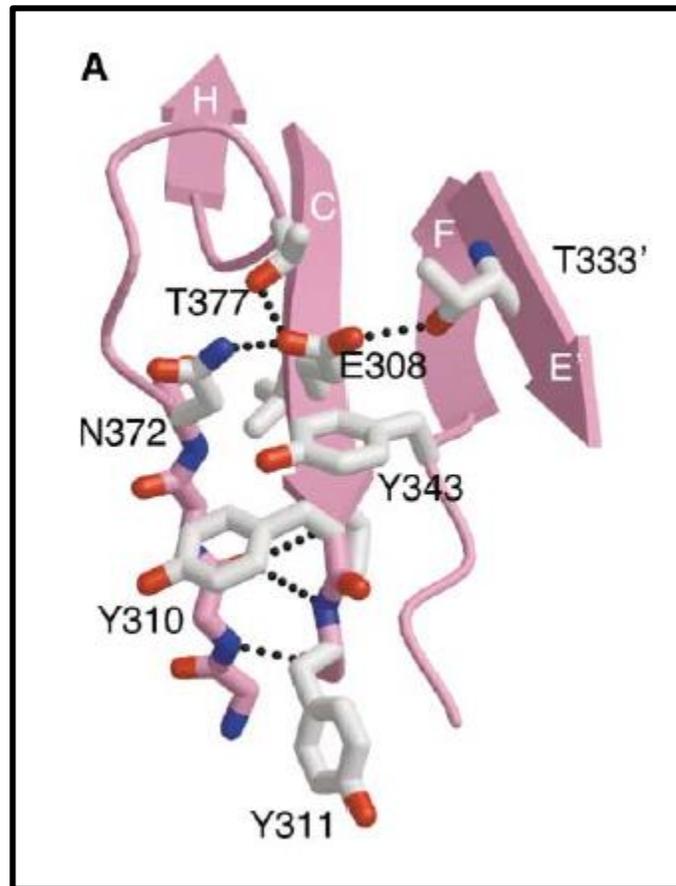
**Figura 29.** Análisis *PolyPhen* de la mutación c.1358C>G; p.N372K. Se indica el puntaje de 0.738, el programa considera que esta variante es posiblemente dañina.



**Figura 30.** Análisis estructural de EDA silvestre y predictivo de EDA mutada con *PyMol Viewer* (estructuras roja y azul empalmadas, respectivamente). Las flechas rojas indican el tallo asa con diferente disposición espacial ocasionada por la mutación p.N372K.

Se predice que la mutación p.N372K altera la disposición espacial de la estructura tallo-asa CD al desestabilizar la conformación de la cadena lateral de la Glu308 por la pérdida de un puente de hidrógeno con la asparagina 372. Se ha demostrado que dicha conformación es importante para la especificidad del ligando con su receptor (Hymowitz et al., 2003), lo cual alteraría la señalización EDA-EDAR-EDARADD y provocaría deficiencias en la diferenciación del ectodermo.

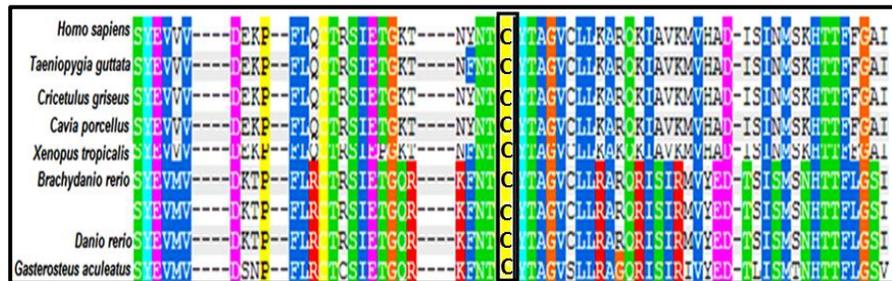
La estructura de la isoforma 1 de EDA se determinó por cristalografía de rayos X de un fragmento de EDA-A1 que contiene los residuos (233-391) e incluye el dominio de homología a TNF que interactúa con su receptor. Los residuos N313 y N372 son sitios glicosilados cuando se expresan en células de mamífero (Schneider et al., 2001). La asparagina 313 se encuentra en la punta del tallo CD y la glicosilación de la cadena lateral no es probable que altere la estructura del ligando o su unión con el receptor (Hymowitz S et al., 2003).



**Figura 31.** Sitio de la proteína EDA denominado interruptor de especificidad donde se muestra la interacción por puentes de hidrógeno de la glutamina 308 con varios aminoácidos adyacentes, incluyendo al sitio de la mutación en la asparagina 372.

El análisis del caso familiar con dos hermanos afectados (Pacientes 10 y 11) identificó una mutación en el exón 8 de *EDA*: c.1038 G>C, p.C346W. El paciente 10 fue reportado el año pasado por otro grupo, por lo que se confirma este hallazgo (Salas-Alanis J et al., 2015). Previamente, en la misma posición de EDA, cisteína 346, ya se había reportado el cambio por tirosina (Cluzeau C et al., 2011). Este residuo se localiza en el dominio extracelular de EDA con homología a TNF y al realizar el alineamiento múltiple, se observó que está altamente conservado en varias especies (Figura 32). El dominio TNF de EDA (presente en sus isoformas 1 y 2) está involucrado en la interacción con su receptor, EDAR. En consecuencia, la proteína mutada sería incapaz de activar la cascada de señalización de diferenciación del ectodermo.

El cuadro clínico corresponde a una forma clásica de DEH, el fenotipo de uno de los hermanos está modificado debido a que el paciente también presenta síndrome por trisomía 21. La madre tiene datos clínicos compatibles con el estado de portadora y aunque no fue posible realizar el estudio molecular confirmatorio en ella, por análisis del árbol genealógico es una portadora obligada.



**Figura 32.** Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de EDA donde se observa la cisteína 346 altamente conservada.

Los residuos contiguos 154-155-156 se vieron afectados en varios de los casos analizados. De hecho, estos residuos están considerados como punto caliente para mutaciones de EDA. En los pacientes no relacionados 4, 5 y 6, observamos una mutación recurrente: la arginina básica 155 cambia por un aminoácido sin carga, cisteína p.R155C (rs13260312). Esta mutación ya ha sido documentada por Monreal et al., 1998; Schneider et al., 2001; Vincent et al., 2001; Fan et al., 2008; Khabour OF et al., 2010 y Gaczkowska A et al., 2016. El fenotipo en estos pacientes corresponde a un cuadro clásico de DEH.

En los pacientes 7 y 8 también identificamos otra mutación que afectó el mismo residuo R156 de EDA. En el paciente el 7 por cisteína (rs13260313) y en el paciente 8, la arginina 156 cambia por histidina (rs132630314), dichos cambios ya han sido reportados por Monreal AW et al., 1998 y Cluzeau C et al., 2011, no describieron un fenotipo característico para dichos cambios.

Aoki N (2000) reportó un cambio de arginina por serina en la posición 156 de EDA en un paciente de dos años de edad, que sufría de fiebres recurrentes y de incapacidad para sudar con cabellera y pestañas normales pero cejas escasas, su cara presentaba un

abombamiento frontal leve y epicanto bilateral. El estudio histológico mostró la ausencia completa de glándulas sudoríparas, además se confirmó la presencia de un solo canino en la mandíbula derecha, sus padres no eran consanguíneos y estaban aparentemente sanos. Se confirmó el estado de portadora de la mutación R156S en la madre del paciente. Clauss F (2010) también reportó un cambio de arginina por glicina en la posición 156 sin hacer mención del fenotipo asociado.

De los pacientes reportados en la literatura con esta mutación, no se ha podido establecer una relación fenotipo-genotipo clara. Dado que abole el punto de corte de furina el cuadro clínico debería ser grave y sin embargo hay expresividad variable (Burger K. et al., 2014). Dentro de la región denominada tallo de EDA se encuentra la secuencia (-Arg-Val-Arg-Arg<sup>156</sup>-Asn-Lys-Arg<sup>159</sup>) que representan secuencias consenso sobrepuestas para un corte proteolítico (Arg-X-Lysy/Arg-Arg↓) mediado por una proteína convertasa denominada furina. Las mutaciones de sentido equivocado en cuatro de los cinco residuos básicos dentro de la secuencia consenso representan aproximadamente el 20% de los casos de DEHLX (Chen Y et al 2001).

En nuestro grupo de pacientes también se encontró una alta prevalencia de mutaciones afectando este sitio (5/12 casos) con mutación en *EDA* (41.6%). La furina es una endoproteasa de serina dependiente de calcio asociada a membrana celular que corta con mayor eficiencia en el extremo carboxilo terminal de una secuencia Arg(P4)-X-Lysy/Arg-Arg(P1) donde los residuos básicos en las posiciones P1 y P4 son críticos para la actividad. El corte proteolítico de EDA por furina produce el fragmento carboxilo terminal con el dominio de homología a TNF asociado a su segmento de colágeno. Este fragmento no se tendrá anclado a la membrana celular, su formación se requiere para la comunicación de EDA entre células y para poder regular la morfogénesis de los apéndices del ectodermo (Chen Y et al., 2001).

Las mutaciones encontradas en los pacientes 3 (exón 1) y 9 (exón 7) ya han sido reportadas (HGMD). La mutación p.H54R fue descrita por Conte C et al., 2008; sin embargo, se limitó a reportar la variación y no hace descripción clínica o discute el posible efecto de la mutación en la proteína. La mutación p.H54R se localiza en el dominio transmembranal de EDA, dominio de naturaleza helicoidal, que alberga la señal de anclaje para proteínas de membrana tipo II. La señal de anclaje consiste en la presencia de un aminoácido cargado positivamente en el extremo amino terminal seguido de aproximadamente 20 aa de naturaleza apolar, dicha señal es necesaria para el transporte de la proteína al interior del

retículo endoplasmico (RE), posteriormente al aparato de Golgi y finalmente a la membrana celular en donde su presencia es necesaria para el proceso de secreción.

A pesar de que la mutación p.H54R cambia un aminoácido básico por otro de naturaleza semejante, por ubicarse en un sitio relevante de reconocimiento para su translocación al RE no se puede descartar un efecto de secreción de EDA alterado, que deberá corroborarse en estudios funcionales posteriores. Adicionalmente, el análisis *in silico* de la mutación por *PolyPhen* indica que el cambio tiene alta probabilidad de ser patogénico con un valor predictivo de 0.96. Hertz JM et al., (1998) identificaron la primera mutación en el dominio transmembrana de EDA que correspondía a un cambio de histidina por tirosina en la posición 54 en una familia con características típicas de DEHLX cuyos síntomas más incapacitantes eran la afección de las mucosas nasal y respiratoria cuya secreción favorecía la formación de costras y la consiguiente obstrucción que se complicaban con episodios recurrentes de sinusitis e infecciones de vías respiratorias superiores, de las cuatro portadoras obligadas en la familia solo una no presentó síntomas asociados a DEH.

La mutación p.Q306H fue descrita por primera vez en un paciente taiwanés de 19 años que desde el nacimiento presentaba los síntomas característicos de DEH (ausencia de dientes, fiebres recurrentes sin infección, ausencia de vello axilar y púbico en la adolescencia y escaso cabello en la cabeza), además presentó pápulas blanquecinas tipo miliar desde la pubertad en la frente, en las mejillas y en la barbilla. De acuerdo a la literatura, estas pápulas se desarrollan gradualmente después de la pubertad. Esta característica se puede explicar por una maduración sexual normal de los pacientes con DEH; los andrógenos ejercen su efecto al iniciar la pubertad sobre las unidades pilo-sebáceas parcialmente defectuosas. Aunque el cabello no se puede desarrollar normalmente debido a un error innato, las glándulas sebáceas presentes al nacimiento comienzan a madurar a su debido tiempo. Este hecho implica que probablemente el desarrollo de las glándulas sebáceas es independiente de la señalización de EDA.

La mayoría de los casos de DEH con pápulas se presentan en pacientes masculinos. Sin embargo, una explicación alternativa puede ser el exceso de andrógenos presente en sujetos masculinos al inicio de la pubertad, ya que un efecto similar de los andrógenos se observa en pacientes masculinos con hiperplasia sebácea neonatal. El paciente 9 con la mutación p.Q306H no presentó pápulas sebáceas, por lo que nuestro estudio apoya la hipótesis de que dicha característica se debe más a una característica propia del género

masculino exacerbado por el efecto de los andrógenos que por un efecto de la mutación (Hsu MML et al., 2003). Lei K (2009) identificó un cambio de glutamina por prolina en la posición 306 de EDA y especuló su posible asociación con agenesia dental.

Las mutaciones causantes de DEH que afectan el dominio TNF de EDA se pueden dividir en tres tipos: 1) mutaciones que afectan a la conformación global de EDA, 2) mutaciones que afectan el sitio de unión con su receptor y 3) mutaciones cuyo efecto es desconocido pero que pueden definir nuevos sitios de interacción. En el primer grupo, las mutaciones ya sea que reemplacen aminoácidos pequeños por residuos más largos que no pueden ser acomodados estructuralmente o reemplazan aminoácidos largos en el centro de la proteína con aminoácidos que no pueden hacer las interacciones necesarias para un empaquetamiento correcto, lo que produce una desestabilización del ligando. Tal puede ser el caso de la mutación identificada en el paciente 7 (c.918 G>C; p.Q306H) que cambia un aminoácido lineal, polar sin carga por uno polar cargado positivamente con un anillo imidazol que puede ocasionar dificultades en el correcto ensamblaje espacial de EDA.

Las mutaciones identificadas en el dominio de homología a TNF de los pacientes 10-11 y 13 son más probables que pertenezcan al segundo grupo de mutaciones ya que se encuentran adyacentes al denominado interruptor de especificidad con el receptor. Además, es posible que se pierda un puente disulfuro necesario para la interacción Cys 332-Cys 346 que une las cadenas E y F de EDA, sin embargo los resultados experimentales de esta interacción no son concluyentes para la isoforma 1 (Hymowitz S et al., 2003). Por último la mutación p.R357W de *EDA* es posible que pertenezca al tercer grupo de mutaciones ya que se encuentra agrupada en la superficie de la proteína junto con otros sitios críticos de mutación y sugiere que forman un sitio de unión adicional. Sin embargo, ya que esta área de superficie del ligando no se espera forme parte del sitio de unión canónico con su receptor ni está involucrado en el empaquetamiento para la formación de dímeros y trímeros, la función de este sitio es desconocido. También es posible que algunas de estas mutaciones afecten deletéreamente el ligando, alterando sus propiedades de solubilidad y plegamiento. Dicha afirmación es apoyada por la observación de que EDA recombinante portadora de la mutación A356N no se secreta correctamente en células de mamífero (Schneider et al., 2001).

Todas las madres de los pacientes con mutaciones en *EDA* estudiadas molecularmente, resultaron portadoras, sólo en una de ellas se infirió su estado de portadora por árbol genealógico y en otra no fue posible realizar el estudio (madre del caso 4). Estos datos

muestran que el estudio molecular debe realizarse en las madres de los pacientes con DEHLX y extenderse a otros integrantes de la familia, aun cuando las madres de los pacientes no presenten datos clínicos, ni haya antecedentes de la enfermedad en la familia. Los resultados moleculares en genealogías extendidas favorecen un mejor asesoramiento genético y la toma de medidas preventivas para una mejor calidad de vida de los pacientes con DEHLX.

En el paciente 14 (masculino) se identificó una mutación *de novo* en *EDAR*, que consistió en la delección en fase de dos timinas en el exón 12 (c.1193-1194 del TT) y que no ha sido descrita previamente. Este es el segundo caso con alteración en *EDAR* identificado en población mexicana. El primer caso fue un cambio de cisteína por tirosina en la posición 71 de *EDAR* reportado por Salas-Alanis J et al., (2015) que afecta un dominio de interacción con su ligando EDA. La mutación identificada en este estudio genera un codón de paro prematuro (p.F398\*), eliminando los últimos 50 residuos del dominio citoplasmático de la proteína silvestre. Al comparar en la literatura con mutaciones que afectan residuos vecinos al 398 vemos que teóricamente se esperaría una proteína inactiva que no interaccionará con *EDARADD* y que probablemente afecte la activación de la señalización *NFKB* y la *JNK* (Shimomura Y. et al., 2004).

En relación al análisis del polimorfismo rs3827760 de *EDAR* en diferentes poblaciones, se ha propuesto que hace aproximadamente entre 25,000 y 40.000 años durante la evolución mongoloide de los Polinesios en el noreste de Asia se produjo una mutación no sinónima, T → C en la región del dominio extracelular “de muerte” de *EDAR*. Esta mutación resultó en sinodancia y dientes “en pala”, pelo grueso, pechos pequeños, mayor densidad de glándulas sudoríparas y talla de glándulas salivales, protusión del lóbulo de las orejas, y se convirtió en un alelo de alta frecuencia en Asia y América, probablemente por selección positiva (Hünemeier T et al., 2013, Adhikari K et al., 2015). Las frecuencias de este polimorfismo (rs3827760) en mexicanos varían dependiendo de la región analizada; por ejemplo, en el proyecto de los 1000 genomas C=0.523, T=0.477; en mayas de Yucatán C=0.114, T=0.886; en pimas C=0.029, T=0.971; totonacos C=0.12, T=0.88 (Hünemeier T et al., 2013).

El polimorfismo rs3827760 conduce a una sustitución funcional en el dominio de muerte intracelular de *EDAR* (p.Val370Ala), este residuo afecta la interacción con el dominio de muerte del adaptador *EDARADD*, el alelo de *EDAR* derivado codifica una proteína con mayor actividad que la ancestral (Mou C et al., 2008). La variación en *EDAR* p.Val370Ala se asocia a morfologías características de los dientes, tipo de cabello y densidad de glándulas sudoríparas en asiáticos del este, donde tiene una frecuencia alta, mientras que está casi ausente en poblaciones europeas y africanas (Fujimoto A et al., 2008). Adhikari K et al,

encontraron una asociación fuerte entre el polimorfismo rs3827760 y ciertas características de la morfología de la oreja como: protrusión, tamaño y unión del lóbulo de la oreja. En nuestro grupo de pacientes, los genotipos resultantes fueron: 10 homocigotos CC, 7 CT y sólo uno homocigoto para el alelo común, TT. Un dato interesante es que el único paciente homocigoto TT es el que presenta menos manifestaciones clínicas de la enfermedad (caso 12) en esta cohorte de pacientes, por lo que el polimorfismo podría considerarse como un factor que participa en la expresividad variable del fenotipo de pacientes con DEH, sin embargo y debido a que se trata de una muestra pequeña de pacientes no es posible hacer esta determinación.

En los cuatro pacientes que no tuvieron alteraciones en los genes estudiados, no se pueden descartar variaciones de secuencia dentro de las regiones promotoras de *EDA*, *EDAR* y *EDARADD*, variaciones intrónicas de los genes mencionados que puedan crear nuevos sitios donadores o aceptores de corte y empalme alternativo que estén afectando la estructura y/o función de las proteínas, mutaciones de secuencia en *WNT10A*, y tampoco se pueden descartar variaciones en otros genes importantes en la diferenciación del ectodermo como *NEMO*, *TRAF6*, *PAX9*, *MSX1* y *XEDAR*.

De los estudios realizados en México para la identificación de mutaciones en pacientes con DEH, este es el primero que utiliza la técnica de MLPA para la identificación de variaciones estructurales y que abordó experimentalmente el estudio de la ICX en un caso con variabilidad fenotípica. Salas-Alanis J et al., (2015) estudió 35 familias mexicanas con DEH, e identificó 15 mutaciones en *EDA* (42.85%), una de ellas confirmada en el mismo paciente en este estudio, sólo una de ellas afectando un sitio de corte y empalme alternativo e identificó una mutación en *EDAR* (2.85%). Pozo-Molina G et al., (2015) identificó una nueva mutación p.L56P que afecta el dominio transmembrana de *EDA* en una familia de 20 miembros (9 hombres, 11 mujeres) de Akil, Yucatán, México con DEHLX. En conjunto estos dos estudios y el presentado en este trabajo confirman la alta prevalencia de mutaciones en *EDA* en pacientes mestizo-mexicanos con DEH y abre la posibilidad de un tratamiento con la proteína recombinante EDI200 en estos casos. Se ha demostrado que EDI200 se une al receptor *EDAR* e induce la activación de NF- $\kappa$ B y además ha sido probada con éxito en dos modelos animales como terapia de sustitución de *EDA* ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) NCT01564225 y NCT01775462) (Huttner K 2014).

## Conclusiones

En esta serie de casos mestizo-mexicanos con DEH se realizó la relación fenotipo-genotipo mediante el análisis por MLPA o secuenciación Sanger en 4 genes causantes de DEH: *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10* y se identificaron mutaciones nuevas. En una familia se confirmó un evento de inactivación del cromosoma X que probablemente modula el fenotipo en las portadoras.

Se confirmó que en nuestro grupo de pacientes la presencia de alteraciones estructurales de los genes involucrados en DEH es baja comparada con alteraciones de secuencia, como ha sido reportado en otras cohortes de pacientes. Estos datos también confirman la alta prevalencia de la forma ligada al X en nuestra población con DEH, sugiriendo que en algunos casos hay penetrancia incompleta en las mujeres por el fenómeno de ICX.

Los resultados moleculares permitieron dar asesoramiento genético y ampliar el espectro de mutaciones conocidas para DEH. La identificación y análisis de las mutaciones en pacientes mestizos mexicanos con DEH contribuyó al mejor entendimiento de la patología.

## Referencias

Adaimy L, Chouery E, Megarbane H, et al. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 821–828.

Adhikari K, Reales G, Smith AJ et al. A genome-wide association study identifies multiple loci for variation in human ear morphology. *Nat Commun.* 2015; 6: 7500.

Aoki N, Ito K, Tachibana T, et al. A novel arginine-->Serine mutation in EDA1 in a Japanese family with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Invest Dermatol.* 2000; 115: 329-330.

Bal E, Baala L, Cluzeau C, et al. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus. *Hum Mutat.* 2007; 28: 703–709.

Bayes M, Hartung AJ, Ezer S, et al. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1661–1669.

Bohring A, Stamm T, Spaich C, et al. WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet.* 2009; 85: 97–105.

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991; 351; 3: 25–29

Burger K, Schneider AT, Wohlfart S et al. Genotype-phenotype correlation in boys with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2014; 164A : 2424-2432.

Chaligné R, Heard E. X-chromosome inactivation in development and cáncer; *FEBS Letters.* 2014; 588: 2514–2522.

Chen Y, Molloy SS, Thomas L et al. Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 19: 7218-7223.

Clarke A, Phillips DI, Brown R, et al. Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dis Child.* 1987; 62: 989–996.

Clauss F, Chassaing N, Smahi A et al. X-linked and autosomal recessive Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia: genotypic-dental phenotypic findings. *Clin Genet.* 2010; 78257-78266.

Clevers H.: Wnt/beta-catenin signalling in development and disease. *Cell*. 2006; 127: 469–480.

Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, et al. Only Four Genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) Account for 90% of Hypohidrotic/Anhidrotic Ectodermal Dysplasia Cases. *Hum Mutat*. 2010; 32: 70–77.

Darwin , C. The Variations of Animals and Plants under Domestication, *John Murray*. 1875.

Fan H, Ye X, Shi L, et al. Mutations in the EDA gene are responsible for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and hypodontia in Chinese kindreds. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 412–417.

Fujimoto A, Ohashi J, Nishida N, et al. A replication study confirmed the EDAR gene to be a major contributor to population differentiation regarding head hair thickness in Asia. *Hum. Genet*. 2008; 124: 179–185.

Gaczkowska A, Abdalla EM, Dowidar KM. De novo EDA mutations: Variable expression in two Egyptian families. *Arch Oral Biol*. 2016; 30: 21-28.

García-Martín P, Hernández-Martin A, Torrelo A. Displasias ectodérmicas: revisión clínica y molecular. *Actas Dermosifiliogr*. 2013; 104: 451-470.

Gendrel AV and Edith Heard E. Noncoding RNAs and Epigenetic Mechanisms During X-Chromosome Inactivation. *Annu. Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 561–80.

Gilmore TD and Wolenski FS. NF-κB: where did it come from and why? *Immunol. Rev*. 2012; 246: 14–35

Graves R. The Whitaker Negroes. In: Spender, S.; Kristol, I.; Lasky, M. J. (eds.): Encounters: An anthology from the first ten years of Encounter Magazine. New York: Basic Books, Inc. (pub.) 1963: . Pp. 92-105.

Gregoriou S, Rigopoulos D, Vergou T, et al. Should we consider hypohidrotic ectodermal dysplasia as a possible risk factor for malignant melanoma? *J Cutan Med Surg*. 2007; 11: 188-190.

Grzeschik KH, Bornholdt D, Oeffner F et al. Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nat Genet*. 2007; 39: 820 – 821.

Guazzarotti L, Tadini G, Mancini GE, et al. Phenotypic heterogeneity and mutational spectrum in a cohort of 45 Italian males subjects with X-linked ectodermal dysplasia. *Clin Genet*. 2015; 87: 338-342.

Häära O, Harjunmaa E, Lindfors PH, et al. Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling. *Development*. 2012; 139: 3189–3199

Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM, et al. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature*. 2001; 414: 913–916.

Hertz JM, Norgaard-Hansen K, Juncker I et al. A novel missense mutation (402C + T) in exon 1 in the EDA gene in a family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin Genet*. 1998; 53: 205-209.

Hug N, Longman D, Cáceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. 2016. *Nucleic Acids Res*. 2016; 29: 1483-1495.

Hünemeier T, Gómez-Valdés J, Everardo P, et al. Frecuencias de un alelo del gen EDAR en totonacos de la Sierra Norte de Puebla y mestizos de la Ciudad de México, *Estudios de Antropología Biológica*. 2013; 16: 453-464.

Hutt FB. An earlier record of the toothless men of Sind. *J. Hered*. 1935; 26: 65-66.

Huttner K. Future developments in XLHED treatment approaches. *Am J Med Genet Part A*. 2014; 164A: 2433–2436.

Hymowitz SG, Deanne M, Compaan MY, et al. The Crystal Structures of EDA-A1 and EDA-A2: Splice Variants with Distinct Receptor Specificity. *Structure*. 2003; 11: 1513–1520.

Jones KL. Hypohidrotic ectodermal dysplasia syndrome. In: Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1997: 540–542.

Kere J, Srivastava AK, Montonen O, et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet*. 1996; 13: 409–416.

Kobiela K, Kobiela A, Roszkiewicz J, et al. Mutations in the EDA gene in three unrelated families reveal no apparent correlation between phenotype and genotype in the patients with an X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet*. 2001; 100: 191–197.

Koppinen P, Pispá J, Laurikkala J, et al. Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. *Exp Cell Res*. 2001; 269:180–192.

Krøigård AB, Clemmensen O, Gjørup H et al. Odonto-onycho-dermal dysplasia in a patient homozygous for a WNT10A nonsense mutation and mild manifestations of ectodermal dysplasia in carriers of the mutation. *BMC Dermatol*. 2016; 16: 3.

Kumar A, Eby MT, Sinha S, et al. The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A. *J Biol Chem* 2001; 276: 2668–2677.

Laurikkala J, Pispala J, Jung HS, et al. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development*. 2002; 129: 2541–2553.

Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell*. 1999; 99: 47–57.

Lei K, Che TJ, Wang JM et al. [Mutation analysis of the eda-A1 gene for hypohidrotic ectodermal dysplasia and construction of recombined eukaryotic expression vector]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009; 27: 610-613.

Lexner MO, Bardow A, Juncker I, et al. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families. *Clin Genet*. 2008; 74: 252–259.  
Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Ann Rev Dev Biol*. 2004; 20: 781– 810.

Lu PD, Schaffer JV. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Dermatol Online J*. 2008; 14: 22.

Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev*. 1972; 47: 1-35.

Martínez F, Millan JM, Orellana C, et al. 1972. 47: 1-35. *Biol Rev* 200 et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia caused by a novel mutation in EDA1 gene: 406T > G (Leu55Arg). 1999. *J Invest Dermatol*. 1999; 113: 285-286.

Mikkola ML, Pispala J, Pekkanen M, et al. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell–matrix adhesion. *Mech Dev*. 1999; 88: 133–146.

Mikkola ML. TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008; 19: 219–230

Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, et al. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet*. 1999; 22: 366–369.

Monreal AW, Zonana J, Ferguson B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. *Am J Hum Genet*. 1998; 63: 380-389.

Mou C, Jackson B, Schneider P, et al. Generation of the primary hair follicle pattern. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 9075–9080.

Mou C, Thomason HA, Willan PM, et al. Enhanced ectodysplasin-A receptor (EDAR) signaling alters multiple fiber characteristics to produce the East Asian hair form. *Hum. Mutat.* 2008; 29: 1405–1411.

Nagy N, Wedgeworth E, Hamada T, et al. Schopf-Schulz-Passarge syndrome resulting from a homozygous nonsense mutation in WNT10A. *J Dermatol Sci.* 2010; 58: 220–222.

Nawaz S, Klar J, Wajid M, et al. WNT10A missense mutation associated with a complete odonto-onycho-dermal dysplasia syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17: 1600–1605.

Nele Hug, Dasa Longman and Javier F. SURVEY AND SUMMARY Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research.* 2016; 44: 1483–1495.

Nelson W, Nusse R. Convergence of Wnt, beta catenin and cadherin pathways. *Science* 2004; 303: 1483 – 1487.

Norderyd J. Multidisciplinary treatment in children with ectodermal dysplasia. *Head Face Med.* 2012; 8: 5.

Ørstavik KH, Knudsen GPS, Nordgarden H, et al. Severe hypohidrotic ectodermal dysplasia in a girl caused by a de novo 9; X insertion that includes XIST and disrupts the EDA gene. *Am J Med Genet Part A.* 2007; 143A: 1510–1513.

Pääkkönen K, Cambiaghi S, Novelli G, et al. The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Hum Mutat.* 2001; 17: 349.

Pozo-Molina G, Reyes-Real J, Mendoza-Ramos MI et al. Novel missense mutation in the EDA1 gene identified in a family with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Int J Dermatol.* 2015; 54: 790-794.

Reyes-Chicuellar N, De Haro R, Jiménez-Flores R et al. Higher-than-expected prevalence of hypohidrotic ectodermal dysplasia in a rural Mexican setting: report of 20 cases. *Int J Dermatol.* 2010; 49:1050-1055.

Salas-Alanis JC, Wozniak E, Mein CA et al. Mutations in EDA and EDAR Genes in a Large Mexican Hispanic Cohort with Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *Ann Dermatol.* 2015; 27: 474-477.

Schneider P, Street SL, Gaide O, et al. Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin A A. *J Biol Chem*. 2001; 276: 18819–18827.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: e57.

Sepulveda W, Sandoval R, Carstens E, et al. Hypohidrotic ectodermal dysplasia prenatal diagnosis by three-dimensional ultrasonography. *J. Ultrasound Med*. 2003; 22: 731-735.

Shimomura Y, Sato N, Miyashita A et al. A rare case of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by compound heterozygous mutations in the EDAR gene. *J Invest Dermatol*. 2004; 123: 649-655.

Thadani KI. The toothless men of Sind. *J. Hered*. 1934; 25: 483-484.

Thurnam J. Two cases in which the skin, hair and teeth were very imperfectly developed. *Proc. R. M. Chir. Soc. London*. 1848; 31: 71-82.

Trzeciak WH and Koczorowski R. Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update. *J Appl Genet*. 2016; 57: 51–61.

Vincent MC, Biancalana V, Ginisty D, et al. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet*. 2001; 9: 355– 363.

Wisniewski SA and Trzeciak WH. A new mutation resulting in the truncation of the TRAF6-interacting domain of XEDAR: a possible novel cause of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J. Med. Genet*. 2012; 49: 499–501

Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*. 2000; 290: 523–527.

Zhang Y, Tomann P, Andl T et al. Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NFkappaB and Wnt/beta catenin signaling pathways in hair follicle induction. *Dev Cell*. 2009; 17: 49–61.

## Recursos electrónicos

<http://www.omim.org/entry/606268>

<http://edimerpharma.com/information-for-patients/treatment-for-x-linked-hypohidrotic-ectodermal-dysplasia/>

<http://personalizedmedicine.partners.org/Laboratory-For-Molecular-Medicine/Tests/Ectodermal-Dysplasia/EDA-Deletion-Duplication.aspx>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>