



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Caracterización molecular de pacientes con sospecha clínica de Displasia Ectodérmica Hipohidrótica en la población española”

Autor:

M^a Carmen Martínez Romero

Directores:

Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro

Dr. D. Guillermo Glover López

Murcia, 15 junio de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Caracterización molecular de pacientes con
sospecha clínica de Displasia Ectodérmica
Hipohidrótica en la población española”

Autor:

M^a Carmen Martínez Romero

Directores:

Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro

Dr. D. Guillermo Glover López

Murcia, 15 junio de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. Dña. Encarnación Guillén Navarro y el Dr. D. Guillermo Glover López como Directores de la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización molecular de pacientes con sospecha clínica de Displasia Ectodérmica Hipohidrótica en la población española”, realizada por Dña. M^a Carmen Martínez Romero en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 15 junio de 2020.

Dra. Dña. Encarnación Guillén Navarro

Dr. D. Guillermo Glover López

RESUMEN

Introducción: la displasia ectodérmica hipohidrótica (DEH) es una enfermedad con base genética en la que se ven afectadas al menos dos estructuras derivadas del ectodermo, los signos predominantes son pelo ralo, dientes anómalos o ausencia de dientes, y disminución o ausencia de sudoración. La DEH está causada principalmente por variantes en los genes que modulan la actividad del factor nuclear kappa beta (NF-kB) que incluyen la vía de señalización ectodisplasina-A (EDA)/EDAR/EDARADD y la vía de regulación NEMO. Estas vías regulan la interacción entre el ectodermo y el mesénquima, perturbaciones en ellas impiden la correcta diferenciación de los derivados epidérmicos. La displasia ectodérmica ligada al X (DEHLX) o síndrome de Christ-Siemens-Touraine (CST) es el subtipo de DEH más frecuente con una incidencia de 1/50.000 a 1/100.000 en el nacimiento de varones. La DEHLX está causada por variantes patogénicas en el gen *EDA* (Xq12-q13.1), que codifica el morfógeno epitelial EDA, de la familia del factor de necrosis tumoral. Las variantes en *EDAR* (2q13), que codifica el receptor de la EDA, o *EDARADD* (1q42.3), que codifica la proteína del dominio de muerte asociada al receptor EDAR, son responsables de la displasia ectodérmica autosómica dominante (DEHAD) y autosómica recesiva (DEHAR). También se han identificado casos de DEH dominantes y recesivas con variantes en el gen *WNT10A* (2q35). Los genes WNT codifican una gran familia de glucoproteínas implicadas en la vía de señalización wnt/ β -catenina, crucial para el desarrollo de los derivados ectodérmicos.

Las displasias ectodérmicas (DE) constituyen un grupo de enfermedades complejas que incluyen >200 entidades diferentes y muchas de ellas con signos clínicos comunes, como hipodoncia, intolerancia al calor y escasez leve de cabello, lo que complica el diagnóstico clínico diferencial de la DEH. Además, variantes detectadas en un mismo gen pueden afectar a un único tejido ectodérmico dando lugar a formas atenuadas como oligodoncia o agenesia dental no sindrómica (ADNS). La identificación de la patología molecular en estos pacientes representa un reto difícil sobre todo si no tienen alteraciones en los genes referidos que clásicamente se han asociado a la DEH.

La secuenciación masiva o Next-Generation-Sequencing (NGS) permite el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias que son genéticamente heterogéneas como las DE.

Objetivos: el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar clínica y molecularmente una serie de pacientes con diagnóstico de sospecha de DEH con alteraciones en al menos dos estructuras derivadas del ectodermo o una sola, si presentaban alteración del sudor o falta de piezas dentarias, debido a la expresividad variable descrita. Por otro lado, con esta caracterización se pretende avanzar en el conocimiento de la base molecular de las DEH en pacientes de la población española y entender los mecanismos patogénicos de dicha enfermedad. Y finalmente, proponer una estrategia de diagnóstico clínico-molecular efectiva para la DEH y la detección de otros tipos de DE con clínica solapante a esta entidad.

Material y métodos: se elaboró un protocolo de estudio multicéntrico en dos niveles para determinar el rendimiento diagnóstico de cada uno de ellos. El primer nivel de estudio se realizó mediante el método convencional de secuenciación Sanger dirigida y la detección de variantes en número de copias (CNV, Copy Number Variaton) mediante Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA) en los genes EDA, EDAR, EDARADD y WNT10A. Para el segundo nivel de estudio se desarrolló un panel de NGS (NGS-ED-v.1) dirigido a secuencias diana de los 89 genes descritos como los más prevalentes en los diferentes tipos de DE.

Resultados: se observó un claro predominio de varones, 62 (70,5%) frente a mujeres, 26 (29,5%), debido a que el gen más representado fue el gen EDA. En cuanto la edad media a la que se alcanza el diagnóstico genético fue de 5,0 años en niños y 26,5 años en adultos.

El abordaje de estudio clásico dirigido mediante secuenciación Sanger y MLPA arrojó un rendimiento del 62,5% (55/88) de casos diagnosticados, mientras que el panel de secuenciación NGS-ED-v.1, produjo un incremento del 12,5% (11/88) más de casos positivos.

En total se detectaron variantes patogénicas en 66 casos, lo que supuso un rendimiento del 75% del protocolo diagnóstico propuesto para población española con sospecha clínica de DEH; se obtuvo rendimiento máximo del 81,4%

(66/88) entre los pacientes con hipohidrosis y un rendimiento mínimo del 50% en pacientes con formas no sindrómicas de DEH representadas por la ADNS.

Se observó alta heterogeneidad genética con la identificación de variantes en 24 genes, 12 de ellos con variantes primarias directamente implicadas en los diferentes tipos de DE: EDA 59,1%, WNT10A 16,7%, EDAR 4,5%, MSX1 3,0%, AXIN2 3,0%, LRP6 3,0%, DSP 1,5%, GJB6 1,5%, FGFR3 1,5%, DLX3 1,5%, IKBKG 1,5% y TP63 1,5%. Estas alteraciones están directamente implicadas hasta en 16 tipos de DE diferentes: DEXLX, DEHAD, DEHAR, agenesia dental selectiva tipo 1 (STHAGX1), incontinencia pigmenti (IP), displasia oculo-dento-digital (OODD), síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge (SSPS), agenesia dental selectiva tipo 4 (STHAG4), agenesia dental selectiva tipo 7 (STHAG7), displasia ectodérmica tipo 3 (ECTD3), síndrome de hendidura-orofacial 8 (OFC8), síndrome de oligodontia y cáncer-colorectal (ODCRCS), displasia ectodérmica tipo 2 (ECTD2), displasia trico-dento-osea (TDO), síndrome lacrimo-auriculo-dento-digital (LADD) y síndrome de eritroqueratodermia-miocardiopatía (DCWHKTA).

Además, se ha detectado una alta heterogeneidad alélica identificándose 85 tipos de variantes diferentes, 63 categorizadas como primarias o causales. Entre estas, 14 no han sido publicadas hasta la fecha en bases de datos genómicas.

Discusión: estos resultados han permitido el diseño de un algoritmo de diagnóstico clínico-molecular efectivo para el abordaje diagnóstico de la DEH y la detección de otros tipos de DE con clínica solapante a esta entidad. Se ha desarrollado el primer panel de genes NGS dirigido al diagnóstico de enfermedades genéticas con compromiso ectodérmico desde un hospital público de nuestra geografía. Este panel puede usarse de manera fiable en el diagnóstico molecular de genes relacionados con la DEH y puede servir como una herramienta primaria antes de la aplicación del WES (Whole Exome Sequencing)/WGS (Whole Genome Sequencing).

PALABRAS CLAVE: displasia ectodérmica hipohidrótica, agenesia dental no sindrómica, oligodontia, diagnóstico genético molecular, vías EDA/factor nuclear NF- κ B, vía Wnt/ β -catenina y TP63.

ABSTRAC

Introduction: hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED) is a genetically based disease in which at least two structures derived from the ectoderm are affected; the predominant signs are sparse hair, abnormal teeth or the absence of teeth, and the decrease or no sweating. HED is primarily caused by mutations in genes that modulate the activity of nuclear factor kappa beta (NF- κ B) which includes the ectodysplasin-A (EDA)/EDAR/EDARADD signaling pathway and the NEMO regulatory pathway. These pathways regulate the interaction between the ectoderm and the mesenchyme; alterations in it disturb the correct differentiation of the epidermal derivatives. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) or Christ-Siemens-Touraine syndrome (CST) is the most common subtype of HED with an incidence of 1/50,000 to 1/100,000 at male birth. XLHED is caused by mutations in *EDA* (Xq12-q13.1), which encodes the epithelial morphogen EDA of the tumor necrosis factor family. Mutations in *EDAR* (2q13), which encodes the EDA receptor or in *EDARADD* (1q42.3), which encodes the EDAR receptor-associated death domain protein, are responsible for autosomal dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia (ADHED) and autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia (ARHED). It also been identified dominant and recessive HED cases due to pathogenic variants in the *WNT10A* gene (2q35); WNT genes encode a large family of glycoproteins involved in the wnt/ β -catenin signaling pathway, which is crucial for the development of ectodermal derivatives.

Ectodermal dysplasias (ED) are included in a group of complex diseases with more than 200 different entities, many of them with common clinical signs, such as hypodontia, heat intolerance and sparse hair, complicating the differential clinical diagnosis of DEH. Furthermore, the variants detected in the same gene can affect a single ectodermal tissue, giving rise to attenuated forms such as oligodontia or non-syndromic tooth agenesis (NSTA). Identifying molecular pathology in this type of patient represents a difficult labour, especially in patients without pathogenic variants in the reported genes that have been classically associated with DEH.

Next-Generation-Sequencing (NGS) allows the molecular diagnosis of hereditary diseases that are genetically heterogeneous, such as ED.

Objetives: the main objective was the clinical and molecular characterization of a series of patients with suspected diagnosis of HED who present alterations in two structures derived from the ectoderm at least or only in one of them, if they presented alteration of sweat or lack of teeth, due to the variable expressivity described. On the other hand, this characterization allows us to advance in the knowledge of the molecular basis of HED in patients from Spanish population and to understand the pathogenic mechanisms of this disease. A final goal was to propose an effective strategy for clinical and molecular HED diagnosis and for detection of other clinical entities with overlapping features.

Material and methods: a multicentre study protocol was developed at two levels to determine the diagnostic yield of each of them. The first level of study was done using the conventional method of directed Sanger sequencing and the detection of copy number variants (CNV) using Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA) in *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* and *WNT10A* genes. For the second level of study, a NGS (NGS-ED-v.1) panel directed to specific target regions of the 89 most prevalent genes in the different ED types were selected.

Results: The most affected sex were men, 62 (70.5%) compared to women, 26 (29.5%), it was due to *EDA* was the most predominant gene involved. Genetic diagnosis is reached at average age of 5.0 years in children and 26.5 years in adults.

The classic approach study by Sanger and MLPA sequencing showed a 62.5% (55/88) yield of diagnosed cases, while the NGS-ED-v.1 sequencing panel, supposed an increase of 12.5 % (11/88) of positive cases.

In total, pathogenic variants were detected in 66 cases, which meant a protocol diagnostic yield of 75% among the Spanish population with clinical suspicion of HED; it showed a maximum yield of 81.4% (66/88) in patients with hypohidrosis and a minimum of 50% in patients with non-syndromic forms of HED represented by NSTA.

High genetic heterogeneity was identified with variants in 24 genes, 12 of them were primary variants directly involved in the different types of ED: *EDA* 59.1%, *WNT10A* 16.7%, *EDAR* 4.5%, *MSX1* 3.0%, *AXIN2* 3.0%, *LRP6* 3.0%, *DSP* 1.5%, *GJB6* 1.5%, *FGFR3* 1.5%, *DLX3* 1.5%, *IKBKG* 1.5% and *TP63* 1.5%

These alterations are directly involved in up to 16 different ED types: DEXLX, DEHAD, DEHAR, selective tooth agenesis type 1 (STHAGX1), incontinence

pigmenti (IP), oculo-dento-digital dysplasia (OODD), Schöpf-Schulz-syndrome. Passarge (SSPS), selective tooth agenesis type 4 (STHAG4), selective tooth agenesis type 7 (STHAG7), ectodermal dysplasia type 3 (ECTD3), orofacial cleft syndrome 8 (OFC8), oligodontia and colorectal cancer syndrome (ODCRCS), ectodermal dysplasia type 2 (ECTD2), tricho-dento-osseous dysplasia (TDO), lacrimo-auriculo-dentodigital syndrome (LADD) and erythrokeratoderma-cardiomyopathy syndrome (DCWHKTA).

Furthermore, high allelic heterogeneity has been detected in ED, identifying 85 different types of variants, 63 categorized as primary or causal. Among these, 14 have not been published to date in genomic databases.

Discussion: these results have allowed the design of an effective clinical-molecular diagnostic algorithm for a diagnostic approach of DEH and the detection of other types of ED with overlapping features to this entity. The first panel of NGS genes designed to molecular diagnosis for ectodermal derivatives impairment diseases has been developed from a public hospital in our country. This panel can be used reliably in the molecular diagnosis of DEH-related genes and can serve as a primary tool prior to the application of WES/WGS.

KEY WORDS: hypohydrotic ectodermal dysplasia, non-syndromic tooth agenesis, oligodontia, molecular genetic diagnosis, EDA/NF- κ B pathways, Wnt/ β -catenin and *TP63*.

AGRADECIMIENTOS

El momento de realizar la tesis doctoral me ha llegado tarde, después de una larga experiencia profesional, y aunque me hubiera gustado desarrollarla antes, otros proyectos y compromisos laborales no me lo han permitido. A pesar de esto, mi primer agradecimiento es con el destino, porque me permitió, a penas recién terminada la carrera, trabajar en el diagnóstico de las enfermedades genéticas, al mismo tiempo que he sido espectadora en primera fila de todos los logros que han ido aconteciendo en este campo durante todos estos años. He vivido con mucha ilusión como estos avances llegaban al laboratorio y a la clínica y se aplicaban para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Yo ya estaba aquí, leyendo cromosomas de la mano de la Dra. Joaquina Gabarrón LLamas, asombrada con la información que desvelaban los cariotipos en oncohematología, cuando estalló la revolución biotecnológica que ocuparía el tiempo de los futuros científicos. Me emocioné al enterarme de las intenciones de esos científicos visionarios que osaban descifrar el genoma humano, y lo consiguieron; lo que nos permitió buscar la base molecular de nuevas enfermedades. Viví como las limitadas opciones que tenían los progenitores angustiados por evitar la recurrencia de una enfermedad genética grave, se ampliaban con la posibilidad de realizar diagnósticos genéticos cada vez más precoces y con técnicas cada vez menos invasivas. Y mientras me entusiasmaba la certeza de que antes o después llegaría el momento de ofrecérselo a los pacientes, yo ya andaba inmersa en la aventura de la genética reproductiva con los doctores Agustín Ballesteros Boluda y José Landeras Gutierrez. Entendí con los pacientes que la misma diversidad genética que nos ayuda a evolucionar como especie también nos enferma o nos impide la reproducción, muchas veces a pesar del gran empeño de las parejas. Y mientras librábamos apasionantes batallas para entender la esterilidad, el fallo de implantación o los abortos de repetición junto a mi compañera y amiga Carmen Méndez Velasco, ya estaba la élite científica desarrollando la tecnología de las ómicas.

La bioinformática y las bases de datos genómicas nos sorprenden diariamente con la posibilidad de poder abordar diagnósticos cada vez más difíciles y complejos, a mí me dio la oportunidad de participar en este reto la Dra

Asunción Fernández Sánchez, mientras que en los laboratorios se incrementan los medios para el diagnóstico de las enfermedades raras, desvelándonos que en nuestra singularidad, todos somos raros. Y ahora, nos ilusionamos con aplicar este conocimiento a la medicina personalizada... y sin agotar todas estas posibilidades, nos llega el conocimiento de la edición genética y nuestro entusiasmo aumenta al imaginarnos lo que esta tecnología puede suponer para el futuro de algunos pacientes.

Parece increíble que a pesar de todos los avances científicos que han ocurrido en este campo, siempre tenemos la impresión de que estamos empezando y que la genética sigue aumentando las expectativas de mejorar nuestra salud. La percepción de que la genética siempre es el futuro me genera un sentimiento de estímulo constante y de agradecimiento vital.

Mientras todo esto acontecía y acontece, yo siempre he estado rodeada de muy buenos compañeros, de los que he aprendido y que me han apoyado durante las diferentes etapas de mi trayectoria profesional, siento que no voy a poder mencionarlos a todos en este apartado, pero que sepan que les estoy igualmente muy agradecida.

Quiero empezar los agradecimientos profesionales actuales, con la persona que me ha dado la oportunidad de hacer esta tesis, mi directora, la Dra. Encarnación Guillén Navarro, a la que admiro por su visión clínica y científica de la genética y a la que concibo como la persona más cualificada que conozco para desarrollar todas las posibilidades que hoy en día nos brinda esta ciencia. También merecen una mención especial mi co-director de tesis y compañero de trabajo, el Dr. Guillermo Glóver López, por su ayuda en el diagnóstico de estos pacientes y por su apoyo diario en el trabajo, el Dr. Pablo Carbonell Meseguer por su brillantez y por permitirme absorber su conocimiento y a la Dra. Isabel López Expósito por animarme constantemente para conseguir este logro y por su amistad en los malos y buenos momentos. También quiero agradecer el compañerismo de todos los facultativos del Centro de Bioquímica y Genética Clínica, así como a los administrativos y a los técnicos del laboratorio de genética molecular, la disponibilidad para ayudarme en cualquier tarea.

Quiero mostrar también mi agradecimiento al equipo multidisciplinar de genodermatosis, a la Dra. M^a Teresa Martínez Menchón por transmitirme la dermatología de un modo tan portentoso, a todo el equipo de la Sección de

Genética Médica, a la doctoras María Juliana Ballesta Martínez, M^a José Sánchez Soler, Ana Teresa Serrano Antón y Lydia Rodríguez Sánchez por su implicación y a las enfermeras y auxiliares por ser el nexo con los pacientes.

Quiero agradecer especialmente la participación en el estudio a los pacientes afectados, al grupo investigador GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica) y a la asociación AADE (Asociación de Afectados de Displasias Ectodérmicas).

Mi agradecimiento también a la UCAM, resaltando a mi compañera la Dra. María Barreda Sánchez, por su alta capacidad que no duda en poner al servicio de los demás y no la ha escatimado conmigo; y a mi tutora, la Dra, Silvia Montoro García a la que descubierto como una gran profesional y con la que gracias a su ayuda, me ha resultado mucho más fácil resolver las labores burocráticas de esta tarea.

Mis agradecimientos personales van dirigidos a mis imprescindibles, a mi familia, por el tiempo que les robo por mi pasión al trabajo, aunque ellos ya saben lo que es la conciliación y que intento recompensarlos cada día. Y muy especialmente a mi marido Javier, a ti, que no me has permitido nunca desistir de hacer la tesis, gracias por estar a mi lado y compartir la vida conmigo; y la dedicación final va para los herederos de nuestro legado genético, porque son los que le dan el sentido a mi vida y gracias a los cuales me ilusiona el futuro: Laura, Patricia, Javier y Marcos.

«I may give an analogous case, communicated to me by Mr. W. Weddenburn, of a Hindoo family in Scinde, in which ten men, in the course of four generations, were furnished, in both jaws taken together, with only four small and weak incisor teeth and with eight posterior molars. The men thus affected have very little hair on the body, and become bald early in life. They also suffer much during hot weather from excessive dryness of the skin. It is remarkable that no instance has occurred of a daughter being affected....though the daughters in the above family are never affected, they transmit the tendency to their sons: and no case has occurred of a son transmitting it to his sons. The affection thus appears only in alternate generation or after long intervals»

El origen de las especies, 1859

Charles Darwin

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	23
ABREVIATURAS.....	29
ÍNDICE DE FIGURAS	37
ÍNDICE DE TABLAS	41
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	45
1.1 IMPORTANCIA DEL TEMA: LA PIEL	45
1.2 VÍAS MOLECULARES EN EL DESARROLLO DEL ECTODERMO	50
1.2.1 Vía de señalización EDA/factor nuclear (kB) NF-kB.....	51
1.2.1.1 Señalización EDA/NF-kB en la piel.....	52
1.2.1.2 EDA/NF-kB y enfermedades de la piel.....	53
1.2.2 Vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina.....	54
1.2.2.1 Señalización Wnt/ β -catenina en la piel.....	56
1.2.2.2 Wnt/ β -catenina y enfermedades de la piel.....	58
1.2.3 Vía de señalización TP63.....	59
1.2.3.1 Isoformas de p63.....	59
1.2.3.2 Señalización TP63 en la piel	62
1.2.3.3 TP63 y enfermedades de la piel	63
1.2.4 Interrelación de las vías implicadas en las displasias ectodérmicas	63
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN	69
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	73
3.1 HIPOTESIS	73
3.2 OBJETIVOS.....	73
CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODO.....	77
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	77
4.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	77
4.2.1 Criterios de inclusión.....	78
4.2.2 Criterios de exclusión	79
4.3 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	79
4.4 VALORACIÓN MÉDICA Y CUESTIONARIO CLÍNICO	80
4.5 PROTOCOLO DE RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	80

4.6 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS GENÉTICO	80
4.6.1 Extracción y cuantificación del ADN	80
4.6.2 Análisis mediante MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification).....	81
4.6.2.1 <i>Fundamento de la técnica</i>	81
4.6.2.2 <i>Interpretación de los resultados de MLPA</i>	82
4.6.3 Secuenciación de Sanger	82
4.6.3.1 <i>Diseño de cebadores específicos de los fragmentos de interés</i>	82
4.6.3.2 <i>Reacción de secuenciación de Sanger (RSS) del FAI amplificado</i>	83
4.6.4 Next Generation Sequencing (NGS).....	84
4.6.4.1 <i>Selección de genes y diseño del panel de captura NGS-ED-v.1</i>	84
4.6.4.2 <i>Preparación de la librería, secuenciación y llamada de variantes</i>	95
4.6.4.4 <i>Validación del panel y confirmación de los resultados</i>	95
4.6.5 Clasificación e interpretación de las variantes identificadas	95
4.6.6 Estudio del patrón de inactivación del cromosoma X	98
4.7 PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO GENÉTICO	98
4.8 VARIABLES DEL ESTUDIO	100
4.8.1 Variables demográficas-clínicas.....	100
4.8.4 Variables del estudio de inactivación del cromosoma X.....	100
4.8.2 Variables de las manifestaciones clínicas.....	101
4.8.3 Variables de la caracterización genotípica.....	102
4.8.5 Variables del rendimiento de la metodología diagnóstica.....	103
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	104
4.10 ASPECTOS ÉTICOS	104
4.10.1 Evaluación del Comité Ético de Investigación.....	104
4.10.2 Consentimiento informado.....	104
4.10.3 Confidencialidad de los datos	105
4.10.4 Financiación del Proyecto	105
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....	109
5.1 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	109
5.1.1 Datos demográficos, edad, sexo y procedencia	109
5.1.2 Características clínicas de los pacientes estudiados	111
5.1.3 Diagnóstico de sospecha de los pacientes estudiados	115
5.2 ANALISIS DE LAS VARIANTES Y GENES IDENTIFICADOS.....	116
5.2.1 Análisis de las variantes obtenidas.....	116
5.2.1.1 <i>Análisis de las variantes según su efecto</i>	116
5.2.1.2 <i>Análisis de las variantes según su patogenicidad</i>	117
5.2.1.3 <i>Análisis de las variantes según su publicación</i>	118
5.2.1.4 <i>Análisis de las variantes según su heredabilidad</i>	119

5.2.2 Genes identificados distribuidos por sospecha diagnóstica	127
5.2.3 Genes identificados distribuidos por diagnóstico molecular	129
5.3 RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS	132
5.3.1 Rendimiento del método de análisis según el algoritmo propuesto	132
5.3.2 Rendimiento del método de análisis atendiendo al diagnóstico clínico de sospecha.....	133
5.3.3 Rendimiento del método de análisis por diagnóstico molecular.	136
5.3.4 Análisis de los casos no concluyentes	139
5.4 ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	139
5.4.1 Análisis de las variables clínicas y los genes identificados.	139
5.4.1.1 Genes implicados en cada una de las alteraciones clínicas.....	139
5.4.1.2. Distribución clínica para cada uno de los genes.	143
5.4.2 Estudio de inactivación del cromosoma X en DE ligadas al X	147
5.4.3 Entidades clínico-moleculares y vías de señalización.....	149
5.4.3.1 Genes de la vía EDA/NF-kB	149
5.4.3.2 Genes de la vía Wnt/ β -catenina	151
5.4.3.3 Genes de la vía de señalización TP63.....	153
5.4.3.4 Otros genes implicados en la etiología de las DE.....	154
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	165
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	165
6.2 RENDIMIENTO DE LA TÉCNICA Y GENES IDENTIFICADOS.....	165
6.3 HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LAS DE.....	166
6.3.1 Los clásicos de la vía EDA/NF-kB.....	166
6.3.2 Vía Wnt/ β -catenina, un gen y diferentes síndromes	169
6.3.3 Vía Wnt/ β -catenina, varios genes y una misma clínica	170
6.3.4 Vía TP63, un gen y diferentes síndromes, cuando el locus manda.....	172
6.3.5 Genes de diferentes vías que interaccionan.....	173
6.3.6 Otros mecanismos que alteran la homeostasis de la piel	173
6.4 INTERPRETACIÓN DE LOS CASOS NEGATIVOS	176
6.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y PROTOCOLO DE ESTUDIO PROPUESTO	176
6.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO	179
6.7 FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN.....	180
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	185
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	189

ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL.	203
ANEXO 2. COMITÉ DE ÉTICA	207
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO DE CESIÓN AL BIOBANCO.....	209
ANEXO 4. CUESTIONARIO CLÍNICO	217
ANEXO 5. PROTOCOLO TOMA DE MUESTRA Y ENVÍO.....	223
ANEXO 6. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES	225
ANEXO 7. CONSENTIMIENTOS DE PARTICIPACIÓN.....	227

ABREVIATURAS

AADE	Asociación de Afectados por Displasia Ectodérmica
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	Autosómica Dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNS	Agenesia Dental no Sindrómica
ADULT	Síndrome acro-dermato-ungueal-lacrimon-dental (Acro-Dermato-Ungual-Lacrimon-Tooth, ADULT syndrome)
AEC	Displasia ectodérmica que se caracteriza por anquilobléfaron, y hendidura labial y/o palatina, o síndrome de Hay-Wells (Ankyloblepharon-ectodermal defects-cleft lip/palate)
APC	Gen de la Poliposis Coli Adenomatosa (Adenomatous Polyposis Coli)
AR	Autosómica Recesiva
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AXIN2	Gen de la proteína inhibidora Axil o conductina
BMP	Proteínas morfogénicas óseas (Bone Morphogenetic Proteins) y nombre de la vía
BRAF	Oncogén B-Raf
CDH3	Gen, caderina 3
CGH	Hibridación Genómica Comparada (Comparative Genomic Hybridization)
CHUK=IKBKA=IKK1	Gen inhibidor de la IKK subunidad alfa
CK1 α	Caseína quinasa 1alfa
CLIP2=CYLN2	Gen, enlazador citoplasmático 2
COL11A1	Gen, colágeno XI alfa
CST	Síndrome de Christ-Siemens-Touraine (Christ-Siemens-

	Touraine syndrome)
<i>CTSC</i>	Gen, catepsina C
<i>CTSK</i>	Gen, catepsina K
DBD	Dominio de unión de ADN
dbSNP	Base de datos de polimorfismos de nucleótidos únicos
DCWHKTA	Síndrome de cabello lanoso-queratodermia palmoplantar-miocardopatía dilatada (Dilated Cardiomyopathy with Woolly Hair, palmoplantar Keratoderma, and Tooth Agenesis)
ddNTP	Didesoxinucleósido trifosfato
DE	Displasias Ectodérmicas
DEH	Displasia Ectodérmica Hipohidráulica/Anhidráulica
DEHAD	Displasia Ectodérmica Hipohidráulica Autosómica Dominante
DEHAR	Displasia Ectodérmica Hipohidráulica Autosómica Recesiva
DEHLX	Displasia Ectodérmica Hipohidráulica Ligada al X
<i>DKC1</i>	Gen, disqueratina
<i>DKK1</i>	Dickkopf, inhibidor 1 de la vía de señalización Wnt
<i>DLX3</i>	Gen, Distal-Less Homeobox 3
DMO	Densidad mineral ósea
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DODD	Displasia oculodentodigital
Dsh	Proteína Dishevelled
<i>DSP</i>	Gen, desmoplaquina
ECTD10A	Displasia Ectodérmica 10A, tipo hipohidráulica con alteración de pelo y uñas y con patrón de herencia autosómico dominante (Ectodermal Dysplasia 10A, Hypohidrotic/Hair/Nail Type, Autosomal Dominant)
ECTD10B	Displasia Ectodérmica 10B, tipo hipohidráulica con alteración de pelo y uñas y con patrón de herencia autosómico recesivo (Ectodermal Dysplasia 10B, Hypohidrotic/Hair/Nail Type, Autosomal Recessive)
ECTD2	Displasia Ectodérmica 2 o tipo Clouston (Ectodermal Dysplasia 2, Clouston syndrome)
ECTD3	Displasia Ectodérmica 3 o tipo Witkop (Ectodermal Dysplasia 3, Witkop syndrome)

<i>EDA</i>	Gen, ectodysplasia A
<i>EDA2R</i>	Gen, receptor EDA2
<i>EDAR</i>	Gen, receptor EDA1
<i>EDARADD</i>	Gen, adaptador del receptor de la EDA
<i>EDSFS</i>	Síndrome de displasia ectodérmica-fragilidad cutánea (Ectodermal Dysplasia-Skin Fragility Syndrome)
<i>EEC</i>	Síndrome ectodactilia-displasia ectodérmica-paladar hendido (Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting, EEC syndrome)
<i>EIF</i>	Epidermis interfolicular
<i>ELN</i>	Gen, elastina
<i>ER</i>	Enfermedades Raras
<i>ERCC2</i>	Gen, proteína de reparación por escisión 2
<i>ERCC3</i>	Gen, proteína de reparación por escisión 3
<i>ERN-SKIN</i>	Red europea de referencia para el estudio de las genodermatosis y enfermedades raras de la piel (European Reference Networks-SKIN)
<i>EVC</i>	Gen, EVC complejo ciliar subunidad 1
<i>EVC2</i>	Gen, EVC complejo ciliar subunidad 2
<i>EVS</i>	Exome Variant Server
<i>EXAC</i>	Exome Aggregation Consortium
<i>FAI</i>	Fragmento de ADN de interés
<i>FDH</i>	Hipoplasia dérmica focal o síndrome de Goltz-Gorlin (Focal Dermal Hypoplasia)
<i>FGF</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos y nombre de la vía
<i>FGFR10</i>	Gen, factor de crecimiento de fibroblastos 10
<i>FGFR2</i>	Gen, factor de crecimiento de fibroblastos 2
<i>FGFR3</i>	Gen, factor de crecimiento de fibroblastos 3
<i>FLNA</i>	Gen, filamina A
<i>FOXP1=WHN</i>	Gen, factor de transcripción Proteína N1
<i>Fz</i>	Proteínas Frizzled de la vía Wnt
<i>GATA3</i>	Gen, factor de transcripción GATA 3
<i>GenomeAD</i>	The genome Aggregation Database
<i>GJA1</i>	Gen, conexina 43
<i>GJB2</i>	Gen, conexina 26

<i>GJB6</i>	Gen, conexina 30
<i>GRCh37</i>	Referencia 37 del consorcio de referencia del genoma humano
<i>GSK3</i>	Gen, glucógeno sintasa-3-quinasa
<i>GTF2H5=TTD</i>	Gen, factor general de transcripción II subunidad 5
<i>GTF2I</i>	Gen, factor de transcripción general 2-I
<i>GTF2IRD1</i>	Gen, GTF2I que contienen dominio de repetición 1
<i>GTF2IRD2</i>	Gen, GTF2I que contienen dominio de repetición 2
HGVS	Recomendaciones para la descripción de variantes de secuencia (Human Genome Sequence Variants)
HPO	Ontología del fenotipo humano (Human Phenotype Ontology)
<i>HRAS</i>	Gen, proteína H-Ras
ID	Dominio inhibidor
<i>IFT122</i>	Gen, proteína de transporte intraflagelar 122
<i>IFT43</i>	Gen, proteína de transporte intraflagelar 43
<i>IKKB=IKK2</i>	Gen, inhibidor IKK subunidad beta
<i>IKBK=IKK1</i>	Gen, inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad gamma
<i>INSR</i>	Gen, receptor de la insulina
IP	Incontinencia Pigmentaria
<i>KCTD1</i>	Gen, dominio de tetramerización del canal de potasio 1
KID	Síndrome de queratitis-ictiosis-sordera (Keratitichthyosis-Deafness, KID syndrome)
<i>KRAS</i>	Gen, proteína K-Ras
<i>KREMEN1</i>	Gen, proteína transmembrana 1 con dominio <i>kringle</i>
<i>KRT14</i>	Gen, queratina 16
<i>KRT16</i>	Gen, queratina 16
<i>KRT17</i>	Gen, queratina 17
<i>KRT6A</i>	Gen, queratina 6 ^a
<i>KRT6B</i>	Gen, queratina 6B
<i>KRT81</i>	Gen, queratina B1
<i>KRT83</i>	Gen, queratina B3
<i>KRT85</i>	Gen, queratina B5
<i>KRT86</i>	Gen, queratina B6
LADD	Síndrome lacrimo auriculo dento digital o síndrome de Levy

	Hollister (Lacrimo Auriculo Dentodigital Syndrome)
LB	Líneas de Blasko
<i>LIMK1</i>	Gen, proteinquinasa homeodominio LIM 1
LMS	Síndrome de miembros y mamas (Limb-Mammary Syndrome)
<i>LRP6</i>	Gen, receptor lipoproteína baja densidad 6
<i>MBTPS2</i>	Gen, proteasa del factor de transcripción de membrana, sitio 2
<i>MEK1=MAP2K1</i>	Gen, proteinquinasa específica1 activada por mitógeno
<i>MEK2=MAP2K2</i>	Gen, proteinquinasa específica 2 activada por mitógeno
MLPA	Multiple Ligation Probe Amplification
<i>MPLKIP=TTDN1</i>	Gen, proteína serina/treonina quinasa PLK1
<i>MSX1</i>	Gen, Msh homeobox 1
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<i>NECTIN1=PVRL1</i>	Gen, proteína 1 receptor poliovirus
<i>NECTIN4=PVRL4</i>	Gen, proteína 4 receptor poliovirus
<i>NF-kB</i>	Gen, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<i>NFKB1</i>	Gen, factor nuclear kappa B subunidad 1
<i>NFKB2</i>	Gen, factor nuclear kappa B subunidad 2
<i>NFKBIA</i>	Gen, inhibidor del factor nuclear NF-kB
NGS	Next Generation Sequencing
<i>NOLA3=NOP10</i>	Gen, proteína nucleolar familia A, miembro 3
OD	Dominio de oligomerización
ODCRCS	Síndrome de oligodoncia y cáncer colorectal (Oligodontia-Colorectal Cancer Syndrome)
OFC8	Síndrome de hendidura orofacial 8 (Orofacial Cleft syndrome 8)
OFD1	Síndrome orofacio-digital 1 (Orofaciodigital syndrome type 1)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OODD	Displasia odonto ónico dérmica (Odonto-Onycho-Dermal Displasia)
<i>PAX9</i>	Gen, factor de transcripción, proteína paired box 9
PCP	Vía de polaridad celular plana
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>PIGL</i>	Gen, proteína de biosíntesis glicosilfosfatidilinositol

<i>PKP1</i>	Gen, Placofilina
<i>POC1A</i>	Gen, proteína centriolar
<i>PORCN</i>	Gen, proteína serina o-aciltransferasa. Isoformas PORCA-PORCE
<i>RECQL4</i>	Gen, ADN helicasa (RecQ helicase-like 4)
<i>RFC2</i>	Gen, factor de replicación C2
<i>RHS</i>	Síndrome de Rapp-Hodgkin (Rapp-Hodgkin Syndrome)
<i>RIPK4</i>	Gen, proteína serina/treonina quinasa RIP
<i>RMRP</i>	Gen, endoribonucleasa mitocondrial
<i>ROGDI</i>	Gen, proteína homóloga ROGDI
<i>RSS</i>	Reacción de Secuenciación Sanger
<i>RTK</i>	Receptores de la tirosinquinasa
<i>SAM</i>	Dominio de motivo alfa-estéril (Sterile Alpha Motif) de la proteína p63
<i>SETBP1</i>	Gen, proteína de unión al dominio SET
<i>SHFM</i>	Gen, síndrome mano partida y pie partido
<i>SHH</i>	Gen, proteína Sonic Hedgehog
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>SNP</i>	Polimorfismo (variación) de un solo nucleótido
<i>SSPS</i>	Síndrome Schöpf-Schulz-Passarge (Schöpf-Schulz-Passarge Syndrome)
<i>STHAG4</i>	Agenesia dental selectiva 4 (Tooth Agnesis, Selective, 4)
<i>STHAG7</i>	Agenesia dental selectiva 7 (Tooth Agnesis, Selective, 7)
<i>STHAGX1</i>	Agenesia dental selectiva ligada al X (Tooth Agnesis, Selective, X-Linked,1)
<i>TA</i>	Dominio transactivador de la proteína p63
<i>TBX3</i>	Gen, factor de transcripción 3 T-Box
<i>TDO</i>	Displasia trico-dento-osea
<i>TERC</i>	Gen, telomerasa ARN
<i>TERT</i>	Gen, transcriptasa telomerasa reversa
<i>TGF-β</i>	Factor de crecimiento transformante beta
<i>TID</i>	Dominio que inhibe la transcripción de la proteína p63
<i>TINF2</i>	Gen, TRF1 del factor 2 de interacción nuclear
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral

TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>TP63</i>	Gen, proteína p63
<i>TRAF</i>	Gen, receptor TNF asociado a factor
<i>TRAF3</i>	Gen, receptor TNF asociado a factor 3
<i>TRAF6</i>	Gen, receptor TNF asociado a factor 6
<i>TRPS1</i>	Gen, factor transcripción en dedo de zinc
<i>TWIST2</i>	Gen, factor transcripción 2 familia twist
<i>UBR1</i>	Gen, proteína ubiquitin ligasa E3 componente 1
UCSC	University of California Santa Cruz
VB	Variante benigna
VOUS	Variante de significado incierto
VP	Variante patogénica
VPB	Variante probablemente benigna
VPP	Variante probablemente patogénica
<i>WDR19=IFT144</i>	Gen, proteína de transporte intraflagelar 144
<i>WDR35=IFT121</i>	Gen, proteína de transporte intraflagelar 121
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
<i>WNT10A</i>	Gen, proteína vía de señalización Wnt, miembro familiar 10 ^a
β -TRCP	Proteína que contiene repeticiones de β -transducina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización EDA/factor nuclear NF- κ B.	53
Figura 2. Vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	56
Figura 3. Estructura del gen y dominios funcionales de la proteína p63.....	61
Figura 4. Interrelación de las vías moleculares implicadas en las diferentes DE...	65
Figura 5. Procedimiento de estudio genético.	99
Figura 6. Edad a la que se realiza el diagnóstico clínico y molecular para cada grupo de edad.....	110
Figura 7. Distribución de los pacientes estudiados por provincias.	110
Figura 8. Frecuencia relativa de los diagnósticos de sospecha que presentaban los pacientes en el momento de ser incluidos en el estudio.....	115
Figura 9. Distribución de los tipos de variantes detectadas, según el efecto de la variante sobre la proteína para cada uno de los genes.	117
Figura 10. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su patogenicidad para cada uno de los genes.....	118
Figura 11. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su publicación para cada uno de los genes.	119
Figura 12. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su heredabilidad para cada uno de los genes.	120
Figura 13. Genes alterados para cada uno de los diagnósticos de sospecha de los pacientes.	128
Figura 14. Genes alterados para cada uno de los diagnósticos moleculares identificados.....	131
Figura 15. Algoritmo del rendimiento diagnóstico para cada nivel de estudio...	132
Figura 16. Rendimiento del método sobre el diagnóstico clínico de sospecha. ...	136
Figura 17. Rendimiento de cada uno de los métodos de análisis para cada uno de los diagnósticos moleculares.	139
Figura 18. Frecuencia de aparición de alteraciones en el sudor en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141
Figura 19. Frecuencia de aparición de la alteración del pelo en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141
Figura 20. Frecuencia de aparición de alteraciones en las uñas en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141
Figura 21. Frecuencia de aparición de alteraciones craneofaciales en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141
Figura 22. Frecuencia de aparición de alteraciones en la piel en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141

Figura 23. Frecuencia de aparición de alteraciones orodentales en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	141
Figura 24. Frecuencia de aparición de alteraciones en la visión en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	142
Figura 25. Frecuencia de aparición de alteraciones en las alteraciones neurológicas en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	142
Figura 26. Frecuencia de aparición de alteraciones en la audición en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	142
Figura 27. Frecuencia de aparición de alteraciones en la inmunidad, infecciones y sistema respiratorios en la cohorte de estudio según el gen implicado.	142
Figura 28. Frecuencia de aparición de alteraciones en el sistema digestivo en la cohorte de estudio según el gen implicado.	142
Figura 29. Frecuencia de aparición de alteraciones del desarrollo pondoestatural/sexual en la cohorte de estudio según el gen implicado.	142
Figura 30. Frecuencia de aparición de otras alteraciones en la cohorte de estudio según el gen implicado.....	143
Figura 31. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>EDA</i>	144
Figura 32. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo para el gen <i>EDA</i> entre ambos sexos.	144
Figura 33. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>EDAR</i>	144
Figura 34. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>AXIN2</i>	144
Figura 35. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>DSP</i>	144
Figura 36. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>FGFR2</i>	144
Figura 37. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>GJB6</i>	145
Figura 38 . Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>IKBK</i>	145

Figura 39. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>LRP6</i> .	145
Figura 40. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>MSX1</i> .	145
Figura 41. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>TP63</i> .	145
Figura 42. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen <i>WNT10A</i> .	145
Figura 43. Distribución del perfil clínico de los pacientes con resultado positivo frente a la distribución del perfil clínico de los pacientes con resultado negativo.	146
Figura 44. Distribución del perfil clínico de pacientes portadores de variantes (VOUS, VPP y VP) frente al perfil clínico de pacientes en los que no se han detectado variantes.	146
Figura 45. Interrelación entre los genes de las vías moleculares implicadas y las diferentes DE detectadas.	175
Figura 46. Protocolo de estudio propuesto para la DEH.	178

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hospitales colaboradores en las diferentes provincias españolas.....	78
Tabla 2. Genes contenidos en el panel NGS-ED v.1.	86
Tabla 3. Fuentes de anotación del programa Alissa Interpret.	96
Tabla 4. Descripción de la población estudiada por sexo y edad.....	109
Tabla 5. Frecuencia relativa de aparición de cada una de las alteraciones fenotípicas consideradas de forma individual y agrupada por órganos o sistemas funcionales alterados.	112
Tabla 6. Variantes genéticas identificadas y sus características: frecuencia alélica, tipo de variante, patogenicidad y número de veces observada.	121
Tabla 7. Frecuencia absoluta de aparición de cada uno de los genes alterados para cada uno de los diagnósticos de sospecha de los pacientes.	128
Tabla 8. Frecuencia absoluta y relativa de cada uno de los diagnósticos moleculares realizados según los genes alterados identificados.....	130
Tabla 9. Rendimiento del estudio atendiendo al método de análisis.	133
Tabla 10. Rendimiento de cada método de análisis para cada grupo de diagnóstico de sospecha	135
Tabla 11. Rendimiento de cada uno de los métodos de análisis para cada uno de los diagnósticos moleculares.	138
Tabla 12. Resultados del estudio de inactivación del cromosoma X para cada una de las mujeres portadores de alteraciones en genes localizados en dicho cromosoma.	148
Tabla 13. Descripción de las diferentes entidades clínico moleculares de DE detectadas en los pacientes de esta serie.....	150
Tabla 14. Resultados del diagnóstico clínico-molecular de la serie de paciente incluidos en el estudio.	156

I – INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DEL TEMA: LA PIEL

La piel es sin duda el órgano más extenso, delgado y uno de los más importantes del cuerpo humano. En cifras, la superficie cutánea es tan amplia como el propio cuerpo, con una extensión promedio aproximada entre 1,6-1,9 m² en el adulto. Tiene un espesor que varía entre 0,05 a 0,5 cm y un peso estimado entre 3-4 kg, lo que equivale al 6-12% del peso corporal.

Su función fundamental es ser barrera protectora entre el medio interno del cuerpo y el ambiente exterior, muchas veces preservando a las estructuras subyacentes y a sí misma de agresiones físicas, químicas y agentes vivos.

Su capa más superficial, la epidermis, de apenas 120-200 micras de espesor, es un órgano dinámico, tanto en relación con el medio externo como interno siendo sus funciones básicas la fotoprotección, la termorregulación, la formación de una barrera física y la protección inmune, además de tener una importancia especial en la vida de relación. La piel y sus anejos: el pelo, las uñas y las glándulas cutáneas, forman el sistema tegumentario, que es una de las estructuras que más se afecta en las enfermedades monogénicas, dándose la circunstancia de que más de un tercio de todas las enfermedades mendelianas muestran anomalías o malformaciones en la piel o en sus órganos anejos (1).

Las enfermedades hereditarias de la piel, conocidas en su conjunto como genodermatosis, constituyen cerca del 7-8% de las enfermedades raras (ER) y representan una parte relevante de la patología y clínica dermatológica. Actualmente, se ha dilucidado la base genética de alrededor de 400 genodermatosis, en su mayoría son enfermedades monogénicas, lo cual permite realizar una clasificación más o menos precisa, su diagnóstico molecular y, en mayor o menor medida, comprender sus mecanismos patogénicos. Muy probablemente, el grupo mayoritario de las genodermatosis lo constituyan las DE.

El término displasia ectodérmica engloba más de 200 enfermedades genéticas diferentes que son heterogéneas en cuanto a su etiología y el fenotipo clínico. La característica común de todas ellas es que están causadas por defectos

del desarrollo en determinados tejidos de origen ectodérmico y que tienen base genética.

La enorme variedad clínica y la gran heterogeneidad genética, asociada a factores como la penetrancia incompleta y la expresividad variable, dificultan frecuentemente su diagnóstico (2), a pesar de que es fundamental establecer un diagnóstico correcto para proporcionar asesoramiento genético adecuado y establecer un óptimo protocolo de seguimiento y tratamiento.

La primera clasificación de las DE fue propuesta por Freire-Maia en la década de los 70, esta categorización es anterior al desarrollo de la genética molecular y se realizó atendiendo a criterios fundamentalmente clínicos, que establecía como "signos clásicos" las alteraciones del cabello, dientes, uñas y/o glándulas sudoríparas cuya frecuencia se estimaba en 87,1%, 78,5%, 73% y 37,4% respectivamente (3, 4); esta clasificación se mostró inicialmente como una herramienta muy útil para la práctica clínica.

En la medida que el conocimiento de la base molecular de las DE iba progresando, otros autores intentaron establecer una nueva clasificación aunando los datos clínicos y moleculares (5-8). En 2008, cuando sólo se conocía la base molecular del 30% de las DE, se celebró una conferencia internacional para su clasificación en Charleston, Carolina del Sur, con la intención de llegar a un consenso para integrar el conocimiento clínico y molecular del momento (9, 10). Esta clasificación fue variando en función de la descripción de nuevos síndromes, la fusión o separación de los ya descritos y el avance en el conocimiento molecular de las DE, correlacionando los determinados tipos de DE con la posibles vías moleculares implicadas en el desarrollo del ectodermo, considerando la existencia de 2 grupos de DE (2):

- Grupo A, que engloba a 163 entidades con alteración en 2 o más estructuras ectodérmicas clásicas. A su vez se distinguen 11 subgrupos, dependiendo de la combinación de estructuras afectadas y si se asocian a alteraciones de otras estructuras ectodérmicas no clásicas (glándula mamaria, tiroides, timo, medula adrenal, sistema nervioso central, melanocitos, etc.). Algunas enfermedades incluidas en este grupo son: la displasia ectodérmica hipohidrótica/anhidrótica (DEH) (8), síndrome de Rapp-Hodgkin, síndrome de Coffin-Siris (11, 12), síndrome cardiofaciocutáneo (13, 14), síndrome Schinzel-Giedion (15) o paquioniquia (16) entre otras. El patrón de herencia de este grupo

puede ser autosómico recesivo (AR) (39,9%), autosómico dominante (AD) (33,7%) o ligado a X (74%), dependiendo de la enfermedad; y no ha sido establecido en el 19% de los casos. La complejidad y heterogeneidad de las DE es muy significativa, pues incluso para un subgrupo clínicamente similar, los genes implicados y los patrones de herencia pueden ser diferentes; así en la DEH existe una forma ligada a X (DEHLX) en el 95% de los casos y formas AD (DEHAD) o AR (DEHAR) en el 5% restante.

- Grupo B, que incluye entidades con afectación de una sola estructura ectodérmica clásica más otro defecto ectodérmico no clásico (como glándulas mamarias) (17).

Recientemente, en 2017, un grupo de expertos, como representantes de diferentes institutos nacionales de salud de ámbito internacional, se reunieron en Bethesda, Maryland, para discutir un nuevo sistema de clasificación para las DE que integrara los nuevos conocimientos sobre el genotipo, fenotipo y las vías moleculares implicadas en el desarrollo de cada tipo de DE. Este grupo propone una definición funcional basada en los sistemas de clasificación anteriores, pero incorporando nuevos enfoques moleculares para su diagnóstico: *“Las DE son condiciones genéticas que afectan el desarrollo y/o la homeostasis de dos o más derivados ectodérmicos, incluidos el cabello, los dientes, las uñas y ciertas glándulas”*. Además, proponen que *las variantes genéticas de los genes que están asociados a DE y que afectan solo a un derivado del ectodermo (fenotipo atenuado) se agrupen como rasgos no sindrómicos del gen causante, como la hipodoncia o agenesia dental no sindrómica (ADNS) asociada a variantes del gen de la Ectodisplasia A (EDA)*. La información para la categorización de las DE incluye: características fenotípicas, número OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), modo de herencia, alteración genética, las principales vías de desarrollo involucradas (EDA, WNT "wingless-type", TP63) o los componentes de estructuras moleculares complejas (como conexinas, queratinas, cadherinas) (18).

La DE más frecuente es la DEH (2) y es el tipo de DE que va a tratarse en esta tesis. La DEH incluye tres subtipos que presentan como síntoma clave una disminución de la sudoración y/o la agenesia dental y son: la DEHLX, la DEHAD y la DEHAR, así como un cuarto tipo poco frecuente que presenta una inmunodeficiencia asociada (DEH con inmunodeficiencia).

La DEH posee una prevalencia aproximada de al menos uno de cada 5.000-10.000 recién nacidos, aunque este dato probablemente suponga una subestimación de la prevalencia, ya que se puede pasar por alto la identificación de muchos individuos durante la infancia, antes de que se manifiesten las características principales. Se ha publicado que los afectados se distribuyen de forma uniforme entre los diferentes grupos raciales y étnicos. (8, 19). La DEHLX o síndrome de Christ-Siemens-Touraine (CST) es el subtipo más frecuente con una incidencia de 1/50.000 a 1/100.000 en nacimientos de varones. Según la prevalencia descrita se estima que en nuestra población pueden hallarse entre 200-400 casos en total. Se estima que el 95% de los pacientes con DEH seleccionados al azar presentan la forma ligada a X y el 5% restante, las forma DEHAD y DEHAR, que afectan a ambos sexos por igual. En la forma ligada al X, las mujeres portadoras pueden ser asintomáticas o presentar un fenotipo más leve y entre un 80-90% muestran algún grado de hipodoncia (ausencia de 1-6 dientes, sin contar los terceros molares) (20). Aproximadamente el 73% de los casos son familiares, con progenitores afectados o portadores (21). Ocasionalmente los familiares de los pacientes afectados solamente muestran una estructura ectodérmica afectada, por lo que pueden pasar desapercibidos clínicamente y únicamente detectarse mediante estudios genéticos.

La DEH, generalmente se caracteriza por una triada de signos que incluyen pelo ralo, dientes anómalos o ausencia de dientes, y disminución o ausencia de sudoración debido a la ausencia de glándulas sudoríparas, lo que da lugar a intolerancia al calor y puede causar episodios recurrentes de hipertermia potencialmente mortales. La epidermis es fina, seca y eccematosa con hiperqueratosis localizada. La mayoría de los pacientes refieren molestias tipo "ojo seco", sequedad nasofaríngea y síntomas similares al asma. La DEH se asocia a rasgos faciales típicos con una frente prominente, cejas y pestañas ralas y finas, arrugas infraoculares, hiperpigmentación periorbital característica, nariz deprimida en forma de silla de montar e hipoplasia de la mandíbula (22). Debido a la hipoplasia glandular ocurren episodios de conjuntivitis, estomatitis (inflamación de la mucosa bucal), disfagia, alteraciones del gusto y del olfato, rinitis atrófica y ozena (atrofia y sobreinfección de la mucosa nasal), faringitis, ronquera, gran susceptibilidad a las infecciones respiratorias y en ocasiones diarrea. A nivel ocular destacan opacidades corneales y cataratas. Alteraciones de

las piezas dentales: anodoncia, hipodoncia de los incisivos y caninos. La hipotricosis es muy llamativa, apareciendo en cuero cabelludo, cejas, barba, axilas y pubis, el pelo es escaso, corto, fino y seco, pero las pestañas son normales. Además, pueden aparecer alteraciones endocrinas, hipogonadismo primario, hipoplasia o aplasia mamaria en las mujeres y se pueden acompañar de otras alteraciones como son leve discapacidad intelectual, dermatitis atópica, asma, etc.

Si bien numerosos genes pueden presentar variantes asociadas a los diferentes tipos de DE perfectamente categorizadas, como en el síndrome CST descrito, en otros casos, diferentes variantes detectadas en ese mismo gen pueden afectar a un único tejido ectodérmico (p. e., cabello, dientes, uñas, glándulas sudoríparas), ejemplos de estas variantes se han encontrado en los genes *EDA* y *WNT10A*, en los que variantes patogénicas dan como resultado la falta de dientes sin ninguna otra característica fenotípica, que se ha descrito como oligodoncia o agenesia dental no sindrómica (ADNS) (23, 24). La pérdida genética de la dentición primaria y/o permanente, es la anomalía dental más común en humanos (137) y que puede presentarse como anodoncia, hipodontia (ausencia de <5 dientes) u oligodontia (ausencia >6 dientes) (excluyendo los terceros molares). La prevalencia de la oligodontia en la población caucásica varía entre 2,6%-11,3% (25, 26). En otro sentido, también se han descrito variantes patogénicas en genes relacionados con las DE que no causan hipohidrosis, un ejemplo lo constituyen variantes descritas en el gen *GJB2* "gap junction protein beta-2", que codifica para la conexina 26, que puede dar lugar a casos de sordera aislada, queratodermia palmoplantar e ictiosis, así como al síndrome de queratitis-ictiosis-sordera (KID).

En la complejidad de las DE, hay que señalar que las causas moleculares de estas enfermedades involucran a muchos genes y a múltiples vías de desarrollo y a componentes de estructuras moleculares complejas que son necesarias para la formación y función normal de los derivados ectodérmicos. También hay que destacar que en algunas DE se altera la interacción epitelio-mesénquima y se afectan las estructuras endodérmicas, como los defectos de la formación de glándulas mucosas en el pulmón y colon que pueden ocurrir en la DEHLX.

Los enfermos de DEH deben evitar una exposición incontrolada a temperaturas elevadas. En neonatos se requiere una monitorización continua de la temperatura corporal en las incubadoras. En niños mayores deben adoptarse medidas de enfriamiento físico. Además, debe realizarse un tratamiento precoz

dental con el objetivo de restaurar su función y mejorar la apariencia. El tratamiento ortopédico suele incluir injertos óseos o procedimientos de elevación sinusal seguidos de la colocación de implantes dentales que sustentan las prótesis dentales. La DEH con inmunodeficiencia requiere junto a terapias de restitución inmune, tratamientos agresivos de las infecciones asociadas o un trasplante de células madre hematopoyéticas.

Si no se establece un diagnóstico precoz en la infancia, la hipertermia puede ocasionar un daño cerebral que puede ser fatal, mientras que un diagnóstico temprano y un manejo adecuado de la enfermedad permiten que la mayoría de los pacientes tengan una esperanza de vida normal.

El conocimiento de los mecanismos biológicos moleculares que subyacen en las displasias ectodérmicas no se requieren solamente para la detección de nuevos casos, sino también para diseñar métodos de prevención eficiente y enfocar un tratamiento individualizado.

1.2 VÍAS MOLECULARES EN EL DESARROLLO DEL ECTODERMO

Una amplia variedad de tejidos tienen origen ectodérmico: el sistema nervioso central y periférico, la adenohipófisis, el cristalino, el epitelio olfativo, parte de los arcos faríngeos, las células pigmentarias, la epidermis y el epitelio de las mucosas. Aunque, la actual definición de DE está limitada a las afecciones de la piel y/o mucosas y sus apéndices, existe una compleja red de vías de señalización que coordinan la formación y función de las diferentes estructuras ectodérmicas. Para el desarrollo de la piel es preciso el intercambio de información e interacción entre el mesodermo y el ectodermo a nivel intracelular y extracelular. La vía de señalización mesodérmica wingless (Wnt) es crucial para la inducción de los apéndices de la piel. La interacción entre las vías de señalización de la ectodisplasia A y la proteína p63 es un buen ejemplo de comunicación entre distintas vías para su correcto desarrollo (27). La vía p63 es fundamental para la maduración de la epidermis, para la diferenciación terminal de los queratinocitos, la adhesión y proliferación y la formación de la membrana basal (28); además, tiene numerosos ligandos y conexiones con otras vías y es también dependiente de regulaciones epigenéticas; por tanto, los fenotipos de p63 son muy diferentes y con expresividad muy variable. La vía TNF- α tiene un

importante papel morfogénico en las estructuras ectodérmicas y, por tanto, variantes patogénicas en esta vía pueden dar incontinencia pigmenti (IP), cilindromatosis y DEH con y sin inmunodeficiencia (29), precisamente esta última también se ha asociado a variantes patogénicas en el gen *TRAF6* y a alteraciones de la unión a ubiquitina (30). En los últimos años se ha demostrado que numerosos genes y sus productos proteicos en distintas vías de señalización, como TNF- α , NF- κ B, Wnt, vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) entre otras, están involucradas en el desarrollo del pelo (31). Variantes patogénicas en genes que codifican para proteínas de adhesión, como los desmosomas, también pueden dar lugar a DE (32).

El conocimiento de las vías de desarrollo, las estructuras moleculares y la relación entre diferentes dominios de estos productos génicos revelan que muchas DE resultan de genes que co-participan en procesos críticos del desarrollo y ensamblaje estructural de los derivados ectodérmicos. A continuación se describen las principales vías, que cuando se alteran, implican el desarrollo de una DE.

1.2.1 Vía de señalización EDA/factor nuclear (κ B) NF- κ B

El factor nuclear (κ B) NF- κ B es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y actúa en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés o la respuesta inmune e inflamatoria, así como en la adhesión celular y en la protección frente a la apoptosis.

El NF- κ B interviene en la regulación de la respuesta celular que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de “acción rápida” y no requieren de una nueva síntesis de proteínas para ser activado, ya que permanece en el citoplasma de la mayoría de las células en estado de inactivación mediante la proteína inhibidora I κ B. La activación de NF- κ B (33) (Figura 1) se inicia a través de la degradación inducida mediante la activación de una quinasa llamada I κ B quinasa (IKK). La IKK está formada por un heterodímero de dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β y por una proteína reguladora llamada NEMO (modulador esencial del NF- κ B, también llamado I κ BKG o IKK γ). Cuando esta es activada por señales, normalmente procedentes de fuera de la célula, la I κ B

quinasa fosforila dos residuos de serina localizados en un dominio I κ B regulador. Una vez fosforiladas estas serinas, las moléculas del inhibidor I κ B son modificadas por un proceso llamado ubiquitinación, que después las lleva a ser degradadas por una estructura celular llamada proteasoma.

La degradación de I κ B libera al NF- κ B que entra al núcleo dónde puede activar la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión de ADN para NF- κ B (Figura 1). La activación de estos genes por NF- κ B induce una respuesta fisiológica, como por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, una respuesta de supervivencia celular, o de proliferación celular. NF- κ B también activa la expresión de su propio represor, I κ B α , que puede volver a inhibir al NF- κ B y, por lo tanto, origina un bucle de auto feedback, que modula su propia actividad. La proteína NEMO se considera la molécula “maestra” que transmite la señalización desde el citoplasma al núcleo, así que la ausencia del gen *NEMO* impide la activación de NF- κ B en respuestas a los estímulos. Tanto la activación como la inhibición de NF- κ B se han asociado al desarrollo de enfermedades inflamatorias cutáneas. Los inductores de la actividad del NF- κ B son altamente variables, y pueden ser desde especies reactivas de oxígeno (ROS), factores de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 1-beta (IL-1 β), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), isoproterenol, cocaína e incluso radiaciones iónicas; y por supuesto, también es un importante inductor el receptor de membrana de la ectodisplasina A (EDA), molécula esencial de esta ruta en la línea de este trabajo (34).

1.2.1.1 Señalización EDA/NF- κ B en la piel

La ectodisplasina A es una proteína soluble (trimérica) que actúa como señal paracrina sobre su receptor de membrana EDAR con dominios homólogos al TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral). Este receptor, presenta en su lado citosólico un dominio de unión a un adaptador conocido como dominio muerte de EDAR, expresado por el gen *EDARADD* y que unido a su receptor activa la ruta canónica NF- κ B (Figura 1). Como se ha mencionado anteriormente, esta activación es dependiente de la molécula NEMO, la activación de esta vía interviene en la formación de los apéndices de la piel. *EDAR* y *EDARADD* son coexpresados en las placodas durante la formación de los folículos pilosos y los dientes, mientras que la expresión de *EDA* se extiende a todo el epitelio

flanqueante. Además de EDA, EDAR y EDARADD, se han identificado otras moléculas que intervienen en esta vía de comunicación entre las células epiteliales y las células subyacentes del mesénquima para los que se ha demostrado su importancia en el desarrollo de los órganos anejos de la piel (35).

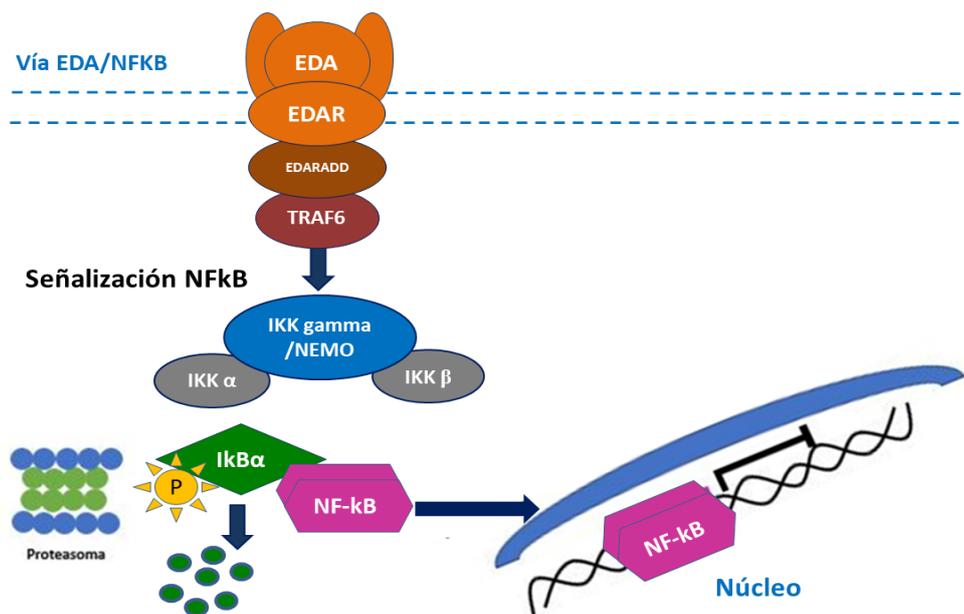


Figura 1. Vía de señalización EDA/factor nuclear NF-κB.

Las formas geométricas representan las diferentes proteínas/ligandos implicados en la vía EDA/factor nuclear NF-κB. Adaptado de Lefevre et al., 2014.

1.2.1.2 EDA/NF-κB y enfermedades de la piel

Así, como veremos, las interacciones en la secuencia de activación EDA-EDAR-EDARADD-TRAF6-NEMO-IκBα- NF-κB están implicadas en el desarrollo de diferentes DEH. Las alteraciones en los genes *EDA*, *EDAR* y *EDARADD* provocan fenotipos que son clínicamente indistinguibles, probablemente porque alteran una señal única en esta vía de señalización, aguas arriba de NEMO-IKK, pero con diferentes patrones de herencia (21). La DEHLX está causada por variantes patogénicas en el gen *EDA* (Xq12-q13.1), que codifica el morfógeno epitelial ectodisplasia-A de la familia del factor de necrosis tumoral. Las

variantes patogénicas en *EDAR* (2q13), que codifica el receptor de la ectodisplasia-A, o *EDARADD* (1q42.3), que codifica la proteína del dominio muerte asociada a *EDAR* (*EDARADD*) son responsables de las DEH AD y AR (36). Se ha descrito que estos genes pueden ser responsables de casi el 90% de los casos de DEH para la población francesa y hasta el 70,8% en la población española (37).

La Incontinentia Pigmenti (IP o síndrome de Bloch-Sulzberger, MIM 308300) está asociada al mal funcionamiento de los genes *NEMO* (también llamado *IKK γ* o *IKBK γ*) o *IbB α* (38). Este tipo de displasia ectodérmica suele ser mortal en varones y se presenta en mujeres durante el periodo neonatal en forma de un exantema ampolloso que sigue las líneas de Blaschko (LB), seguido por placas verrugosas que progresan con el tiempo a máculas hiperpigmentadas lineares y curvilíneas. La IP se caracteriza por cursar con anomalías dentarias, alopecia y distrofia ungueal, afectando ocasionalmente a la retina y al sistema nervioso central (SNC). La mayoría de las variantes identificadas conducen a un truncamiento en el gen *NEMO* (39). El 70-80% de los pacientes tienen una misma delección genómica entre los exones 4-10 en dicho gen, causada por un reordenamiento genómico recurrente que involucra un pseudogen (*IKBKGP1*) ubicado en las proximidades a *NEMO* (40). Son también responsables de algunos casos de DEH, variantes en *TRAF6* (41), *NFkBIA* (42) o *XEDAR/EDA2R* (43)

Las alteraciones en la vía EDA afectan al desarrollo de los apéndices ectodérmicos, pero en general, no lo evitan, sino que suelen presentar defectos de forma, tamaño, posición o número en el organismo. El comienzo de la formación de un apéndice de la piel lo determina el desarrollo de una placoda. La placoda, posteriormente se invagina para formar un brote que crece rápidamente hacia la dermis y encierra un grupo de células de la dermis que formarán la papila dérmica (44). No obstante, está demostrado que el desarrollo de las placodas es el resultado de complejas interacciones recíprocas entre las vías de señalización Wnt, FGF y vía BMP (proteínas morfogénicas óseas) (45).

1.2.2 Vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina

Las moléculas Wnt son glucoproteínas ricas en cisteína localizadas en dominios altamente conservados que funcionan como morfógenos y que son

secretados por células que activan los receptores de superficie en células o tejidos vecinos, regulando así la proliferación, supervivencia o diferenciación celular. Se han descrito diecinueve proteínas o ligandos Wnt, que comparten funciones celulares superpuestas, están codificadas por el genoma de mamíferos y que se expresan en la piel: Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 y Wnt16. Los ligandos Wnt10 inician al menos tres señales intracelulares que inician diferentes cascadas, la vía Wnt canónica (dependiente de β -catenina), la vía de polaridad celular plana (PCP) y la ruta Wnt / Ca^{2+} (46).

Las proteínas Wnt se unen a complejos de receptores heterodiméricos. Estos receptores conforman un complejo entre la proteína Frizzled (Fz) y la proteína LRP5/6 (47) (Figura 2). Las proteínas Fz son receptores de siete dominios transmembrana. Contienen un dominio N-terminal extracelular y dominios enriquecidos en cisteína en los que se acopla la proteína Wnt. Las proteínas Wnt pueden unirse a múltiples proteínas Fz y viceversa. La unión del ligando Wnt induce un cambio conformacional, con la consiguiente dimerización del receptor. Seguidamente recluta y fosforila a Dishevelled (Dsh). Dsh bloquea un complejo proteico encargado de degradar la β -catenina. Este complejo proteico está formado por las proteínas Axina, APC, GSK3 y $\text{CK1}\alpha$. La fosforilación es una señal para la ubiquitinación y degradación por el proteasoma. En presencia de ligando Wnt (vía activa), se recluta la proteína Dsh que inactiva al complejo proteico formado por GSK3, Axina y APC, de manera que la β -catenina permanece sin fosforilar en el citoplasma y se transporta al núcleo actuando como un factor de transcripción, regulando la expresión de genes de proliferación celular (como ciclina D y c-Myc).

En ausencia de ligando Wnt, GSK3 se une al resto de proteínas del complejo de degradación en el citosol y fosforila la β -catenina, esta fosforilación es una señal para su ubiquitinación por parte de la proteína β -TrCP (E3 ubiquitin ligasa). La β -catenina, una vez ubiquitinada, es degradada por el proteasoma y no ejerce su función en el núcleo (48, 49). Esta ruta también se puede ver perturbada por inhibidor de Wnt que se expresa naturalmente de forma ectópica, dickkopf-1 (DKK-1). DKK1 es un antagonista de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina que actúa aislando el correceptor LRP6, lo que le impide activar la ruta de señalización de WNT. También se ha demostrado que DKK1 antagoniza la vía

Wnt/ β -catenina a través de una reducción en β -catenina, alterando la formación de los apéndices epidérmicos, (50).

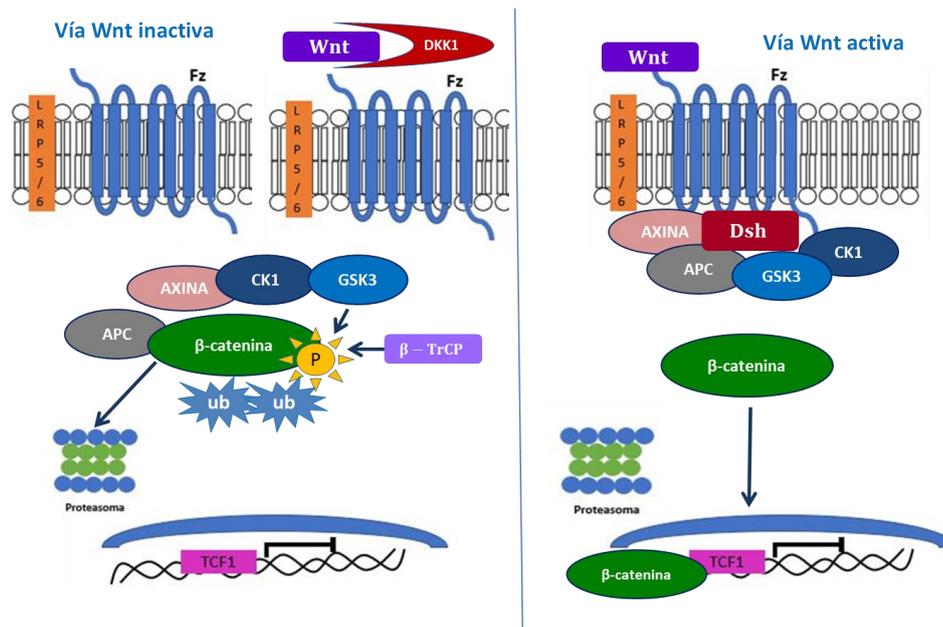


Figura 2. Vía de señalización Wnt/ β -catenina.

Las formas geométricas representan las diferentes proteínas/ligandos implicados en esta vía. Adaptado de Alonso et al., 2012.

1.2.2.1 Señalización Wnt/ β -catenina en la piel

La señalización de Wnt está involucrada en el mantenimiento de población de células progenitoras de la piel y por lo tanto juega un papel decisivo en múltiples pasos durante el proceso de desarrollo y regeneración de la piel (51, 52). El desarrollo del folículo piloso depende de la estratificación de la epidermis embrionaria y comienza con el engrosamiento local de la superficie del epitelio, la formación de la placoda del pelo, seguido por agrupamiento de fibroblastos subyacentes (53). Las ocho fases de la morfogénesis del folículo piloso cubren la formación de la placoda capilar, la organogénesis del folículo piloso y su citodiferenciación. Todos estos procesos se basan en la estrecha interacción entre la vía de señalización de Wnt y otras vías morfogenéticas como Hedgehog, Notch

y BMP, que orquestan una comunicación inductiva recíproca entre el epitelio y el mesénquima inferior (54).

Los ligando Wnt son las primeras señales involucradas en la inducción de la placoda del pelo y la β -catenina activa, están presentes tanto en células epidérmicas como dérmicas de la piel en desarrollo (45). De modo que, la interrupción de β -catenina en el epitelio de la piel del ratón o en la dermis perjudica el inicio del desarrollo del folículo piloso (55).

La señalización mediada por Wnt surge primero por vía intra-epidérmica, seguida de una comunicación dinámica recíproca epidérmica-dérmica y la organogénesis del folículo piloso. Una actividad sostenida de β -catenina dependiente de Wnt en la piel en desarrollo aumenta el número de placodas del cabello y el tamaño de la placoda, con perturbaciones en su distribución espacial (56, 57).

Las células madre epidérmicas multipotentes contribuyen, en todos los tipos de células epiteliales, en la formación de los apéndices de la piel, como los folículos pilosos y glándulas (58). Su continua proliferación asegura la constante renovación del epitelio y el reemplazo post-daño (59). La homeostasis del epitelio de la piel se mantiene por las células madres epiteliales en la región del bulbo, el istmo y la zona de unión, así como por la capa basal de la epidermis interfolicular (EIF). Datos recientes sugieren que la mayoría las células basales pueden actuar en un momento determinado como un equivalente funcional a las células madres en la reconstitución de la capa superior de la piel (60, 61).

Los folículos pilosos maduros realizan rondas cíclicas de crecimiento (anágeno, que dura tres años en promedio), regresión (catágeno, que dura varias semanas) y reposo (telógeno, que dura varias semanas). Durante el ciclo del cabello se utilizan vías de señalización morfogenéticas similares a las que sucede en el tejido embrionario. Así que, la activación ectópica transitoria de β -catenina en el epitelio de la piel adulta supone el comienzo anágeno en el ciclo de los folículos pilosos, y también contribuye a la formación del cabello nuevo lo que indica que la β -catenina, en la vía de señalización Wnt, es suficiente para inducir un nuevo crecimiento del cabello (62). Mientras que la supresión de β -catenina en las papilas dérmicas adultas evitan la progresión de la fase anágena, lo que sugiere contribución dérmica en el ciclo del folículo piloso (60). Por esto, varios estudios apoyan el concepto de que la falta de β -catenina en la señalización de

Wnt afecta la proliferación de células madre foliculares y a la regeneración de los folículos capilares (55, 63).

Del mismo modo, la actividad sostenida de Wnt en la epidermis interfolicular conduce a un agrandamiento del folículo, con epitelio hiperplásico, con incremento en el grosor de la dermis y epidermis (61). Sin embargo, una EIF deficiente en Wnt altera la formación del pelo, el desarrollo del folículo piloso y lleva a la formación de quistes epidérmicos, reduciéndose la proliferación de la dermis y la diferenciación subdérmica. Los resultados indican que el mantenimiento adecuado de la EIF requiere un control equilibrado de la vía señalización Wnt.

La comunicación intercelular entre los queratinocitos epidérmicos y los fibroblastos dérmicos no se limitan al adecuado desarrollo del folículo piloso y glándulas sebáceas, sino que también afecta a la constitución de la dermis subyacente y subcutánea. Como tal, la señalización Wnt sostiene la proliferación de fibroblastos dérmicos y el espesor dérmico, así que la interrupción de la homeostasis de la piel por disrupción de esta vía se correlaciona con el desarrollo de enfermedades de la piel y sus apéndices (64).

1.2.2.2 *Wnt/β-catenina y enfermedades de la piel*

Mientras que los defectos de la diferenciación en el folículo piloso puede conducir a trastornos de pérdida de cabello como la alopecia *universalis*, la proliferación incontrolada del folículo piloso puede causar tumores foliculares (58). El vínculo genético entre la agenesia dental y la vía Wnt también se ha evidenciado, primero mediante la identificación de una mutación del gen *AXIN2* en una familia de oligodoncia (OMIM: 608615). *AXIN2* codifica un inhibidor intracelular de la señal de Wnt/β-catenina y se expresa altamente en el esmalte y en los odontoblastos mesenquimatosos durante la formación del diente. Se descubrió que variantes tipo *missense* en *AXIN2* aumentan la degradación de β-catenina y reducen la activación de Wnt, mientras que las variantes truncantes parecían aumentar la activación de Wnt/β-catenina (65).

Así, el gen *WNT10A* es importante para la formación de los dientes y los folículos pilosos, la regeneración de la epidermis, las papilas linguales y la función de las glándulas sudoríparas. Además, variantes en *WNT10A* también se

han identificado en casos de hiperqueratosis familiar, DEHAD y DEHAR, como: la displasia odonto-ónico-dérmica (OODD, MIM 257980), el síndrome de síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge (SSPS, MIM 224750) y la oligodoncia (STHAG4, MIM 150400) (66). La hipoplasia dérmica focal humana (FDH, MIM 305600), también conocida como Síndrome de Goltz-Gorlin, genéticamente se correlaciona con deterioro en la señalización de Wnt. La FDH es un trastorno dominante ligado al X causado por variantes patogénicas en el gen *PORCN* y se caracteriza por piel hipoplásica, así como malformaciones digitales, oculares y malformaciones dentales (67).

Se han asociado alteraciones en otros genes de esta vía implicados en diferentes anomalías orofaciales como la oligodoncia o agenesia dental no sindrómica (ADNS) relacionadas con variantes patogénicas en los genes *LRP6*, (STHAG7, MIM 616724), *PAX9*, (STHAG3, MIM 604625) y *MSX1* (STHAG1, MIM 106600). Otras entidades con clínica solapante como la oligodoncia y el síndrome de predisposición al cáncer se producen con alteraciones en el gen *AXIN2* (ODCRCS, MIM 608615).

1.2.3 Vía de señalización TP63

El factor de transcripción p63 es codificado por el gen *TP63*, que se localiza en el cromosoma 3 (locus 3q27) y es un importante regulador del desarrollo embrionario y del mantenimiento de la homeostasis en el epitelio estratificado en adultos. Este gen es responsable de activar al menos otros 520 genes e iniciar numerosas vías de señalización críticas, incluida la vía Wnt (como se ha comentado, es responsable de la formación del folículo piloso), la vía EDA/NF-kB (crítica para el desarrollo del folículo piloso, glándulas sudoríparas y dientes) y la vía Notch (subsidiaria de provocar que las células madre se diferencien en la epidermis) (68).

1.2.3.1 Isoformas de p63

El factor de transcripción p63 se describió inicialmente como un factor transcripción de queratinocitos, y es homólogo a p53 en tejidos epiteliales de rata (69). Posteriormente se descubrieron seis isoformas resultantes de dos promotores

alternativos (TA y ΔN) y se identificaron tres formas de *splicing* alternativo, (α , β , γ) (70) (Figura 3). La isoforma TA contiene tres exones específicos de TA, exón 1, 2 y 3, y codifica un dominio transactivación (TA1) que es homólogo al dominio de transactivación de la proteína p53. Otro promotor origina una isoforma más corta denominada ΔN , y su inicio de la transcripción tiene lugar en el exón 3', este promotor es específico de la isoforma ΔN . Inicialmente, la isoforma ΔN se consideró transcripcionalmente inactiva (no canónica), funcionando como una variante negativa dominante hacia la isoforma TA, porque carece de la transactivación típica dominio TA1. Sin embargo, posteriormente se ha reconocido que la región N-terminal de la isoforma ΔN también posee actividad transactivación, y por lo tanto se denomina TA ΔN . En el extremo C, la isoforma más larga es la isoforma α que contiene todos los exones 3'. A nivel de proteína, la isoforma α contiene un dominio de motivo alfa-estéril (SAM) que se cree que está involucrado en las interacciones proteína-proteína (71) y un dominio inhibidor de la transactivación (TID) que inhibe la actividad del dominio TA1. Otras dos isoformas, β que carece del exón 13 y γ que no tiene los exones 11-14 pero tiene un exón específico de γ 10', no contiene el SAM ni Dominios TID. En el extremo N-terminal de la proteína p63, se localiza un lugar de inicio alternativo de la traducción ubicado en el cuarto exón que origina una isoforma $\Delta\Delta N$ que carece de los primeros 26 aminoácidos de la isoforma ΔN en los queratinocitos epidérmicos (72).

En un estudio sobre Síndrome AEC/RHS, se encontraron variantes de parada dentro de los primeros 26 aminoácidos de p63 en varios pacientes. Para sorpresa de los autores, se detectó la transcripción TP63, en lugar de ser degradado por completo a través del mecanismo de descomposición que es común para detener las mutaciones. Esta observación incidental condujo a la identificación de un sitio de inicio de traducción alternativo aguas abajo de todas las variantes de parada. Este sitio alternativo de inicio de traducción da lugar a la variante de proteína $\Delta\Delta N$ en queratinocitos de pacientes AEC/RHS, y también está presente en los queratinocitos de controles sanos, aunque a un nivel más bajo que la isoforma ΔN .

En el extremo C-terminal, otras dos isoformas, δ y ϵ (Figura 3), fueron identificadas mediante análisis bioinformáticos utilizando el *splicing* alternativo.

La isoforma δ es una variante alternativa que carece de exón 13. La isoforma ϵ está generado por un codón de parada prematuro que se encuentra en exón 10.

De este modo, TP63 puede comprender hasta cinco tipos de dominios (Figura 3), dependiendo de la isoforma, y puede contener un dominio de transactivación (TA), un dominio de unión de ADN (DBD), un dominio de oligomerización (OD), un motivo alfa estéril C-terminal (SAM) y/o transcripción C-terminal y un dominio inhibitorio (ID) (73). El N-terminal puede consistir en un dominio TA o una versión truncada (Δ N) que carece del dominio ácido TA que se deriva de un promotor alternativo y un codón de iniciación en el intrón 3. El extremo 3' de TAp63 y Δ Np63 puede empalmarse alternativamente para producir isoformas α , β , γ y δ , mientras que la isoforma ϵ se forma a partir de la terminación transcripcional en el exón 10. TAp63 α y Δ Np63 α contienen un dominio SAM que se cree que está involucrado en las interacciones proteína-proteína y un dominio inhibidor de la transactivación (TID) que inhibe la actividad del dominio TA1 de extremo N-terminal (74).

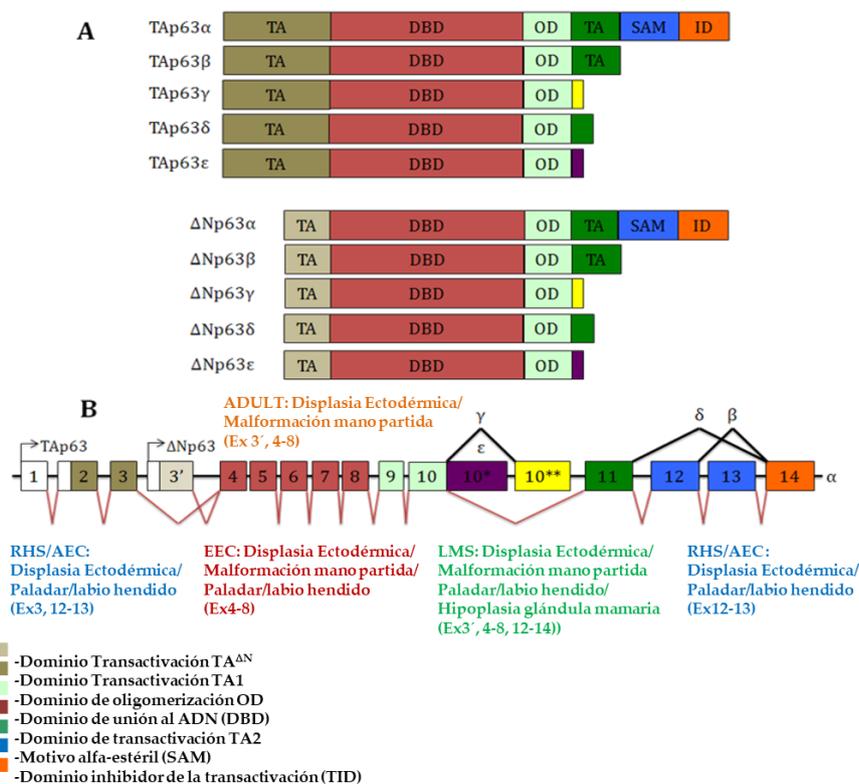


Figura 3. Estructura del gen y dominios funcionales de la proteína p63. Adaptado de Soares et al., 2018.

1.2.3.2 Señalización TP63 en la piel

La isoforma TA se requiere para el inicio de la estratificación epidérmica y Δ N se requiere para la proliferación del epitelio basal, ambas isoformas identificadas intervienen en la diferenciación y desarrollo ectodérmico y contienen el dominio de unión al ADN (DBD) y de oligomerización (OD). La isoforma Δ N es la principal isoforma funcional en células como: tejido epitelial, oral, dental, corneal y en células epiteliales pulmonares (75-78). El promotor en Δ N es el único promotor activo y el exón 3 'es el primero expresado detectado en células epidérmicas a lo largo de la estratificación epidérmica. La isoforma Δ N es la única isoforma expresada abundantemente en numerosas células epiteliales, como los tejidos orales, glándulas mamarias y hasta en 40 tipos diferentes de células humanas (79). A diferencia de la abundante expresión de la isoforma Δ N en células epitelial, la isoforma TA generalmente se expresa a bajo nivel en células no epiteliales. Aunque el hallazgo de nuevos análisis genómicos (79) (80) no excluyen la posibilidad de que la isoforma TA se exprese en un nivel muy bajo por debajo del umbral de detección, emiten dudas sobre la importancia de la isoforma TA en las células epiteliales, dado que su expresión es de al menos varias magnitudes más baja que la isoforma Δ N. Curiosamente, la isoforma TA se ha demostrado que juega roles en varios órganos y tejidos aparte de la epidermis. TAp63 se expresa en ovocitos y juega un papel importante en el control de la apoptosis en respuesta al daño del ADN (81). En la cóclea, la isoforma TA también se expresa y regula la vía de señalización de Notch, que se requiere para el correcto desarrollo de la cóclea (82). Adicionalmente, se ha encontrado que TAp63 se expresa en la etapa tardía de la miogénesis (83) y en el desarrollo de cardiomiocitos (84).

En cuanto a las isoformas p63 C-terminales, la isoforma α es la predominante en la mayoría de las células que expresan p63 (79) aunque las isoformas β , δ y ϵ también se expresan a un nivel bajo (74, 79). La isoforma γ se expresa en las células musculares (74, 83), células cancerosas inmortalizadas (74) y líneas celulares de carcinoma de células escamosas (79). Como la isoforma α es la más abundante en las células, se ha propuesto que la mayor parte de la actividad funcional p63 es impulsada por dicha isoforma (79).

1.2.3.3 *TP63 y enfermedades de la piel*

Hemos visto que el factor de transcripción p63 codificado por *TP63* es un importante regulador del desarrollo embrionario y de mantener la homeostasis en epitelios estratificados en adultos (76). Las variantes patogénicas en heterocigosis en *TP63* son responsables de al menos siete trastornos autosómicos dominantes con manifestaciones ectodérmicas muy diferentes y con una buena correlación fenotipo-genotipo: síndrome de anquilobléfaron-displasia ectodérmica-fisura labiopalatina (AEC, MIM 106260), síndrome ectrodactilia-displasia ectodérmica-paladar hendido (EEC, MIM 604292), síndrome acro-dermato-ungueal-lacrimon-dental (ADULT, MIM 103285), síndrome de Rapp-Hodgkin (RHS, MIM 129400) y síndrome de miembros y mamas (LMS, MIM 603543), malformación de mano partida/pie partido (SHFM4, MIM 605289) y labio y/o el paladar hendido no sindrómico (OFC8, MIM 618149).

1.2.4 **Interrelación de las vías implicadas en las displasias ectodérmicas**

La homeostasis epidérmica requiere de un equilibrio delicadamente ajustado entre la proliferación de la capa basal y la diferenciación de su estrato corneo terminal hasta formar una barrera epidérmica funcional y protectora. Las interrupciones genéticas en la diferenciación epidérmica causan enfermedades que afectan a más de una de cada cinco personas. El aumento de las investigaciones sobre los genes afectados en estas enfermedades ha revelado el papel central de las vías anteriormente descritas en el desarrollo de la epidermis (70) (Figura 4); además de la implicación de otras vías como Notch, TGF β y Ras/MAPK (85). A medida que se establezca la base genética para todas las enfermedades de la piel durante los próximos años, surgirán oportunidades adicionales para una intervención terapéutica efectiva que integre las vías afectadas con las alteraciones genéticas recientemente descubiertas.

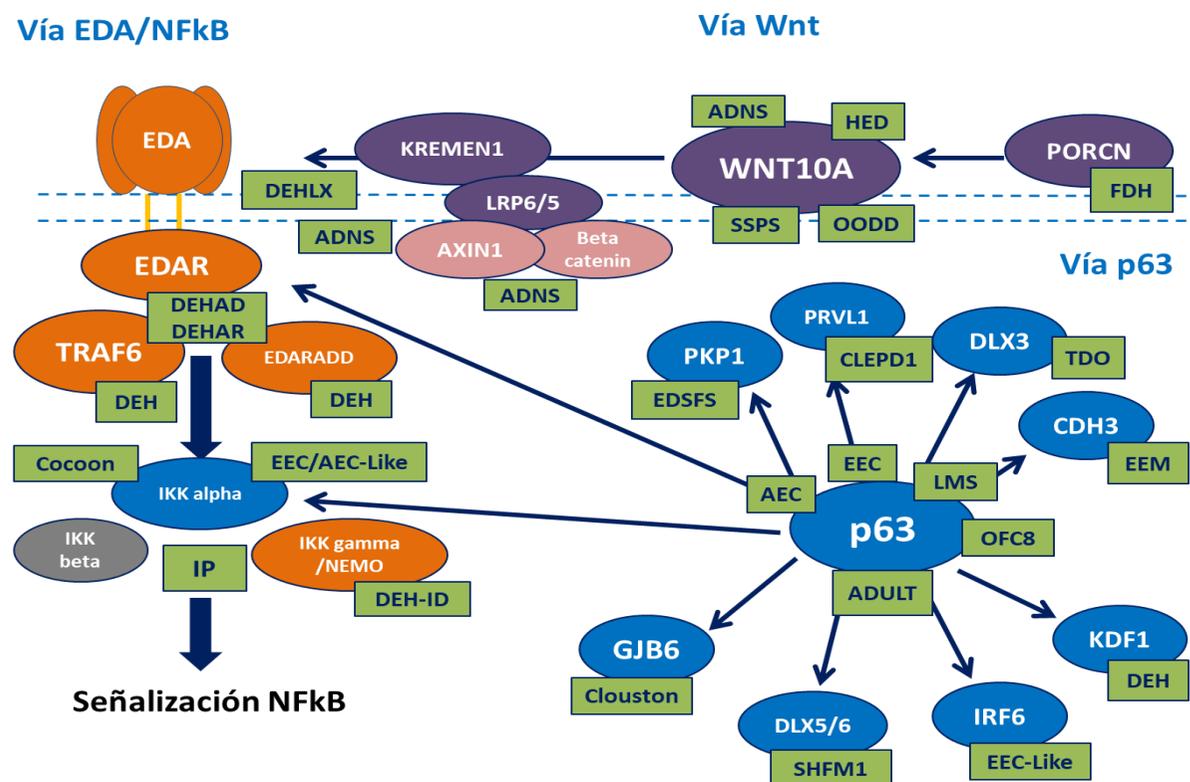


Figura 4. Interrelación de las vías moleculares implicadas en las diferentes DE.

Los genes de la vía EDA/NF- κ B están representados por óvalos de color naranja, los genes de la vía Wnt están representados por óvalos de color púrpura y los implicado en la vía p63 por óvalos azules. Las abreviaturas en los recuadros de color verde indican diferentes tipos de DE. Adaptación de Wright et al., 2018.

II – JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la prevalencia de las DE sigue siendo desconocida; los registros basados en la frecuencia de ocurrencia en la población son difíciles de establecer, algunas condiciones que cumplen clínicamente con la definición de DE, pero cuya etiología se desconoce, pueden agruparse en otros grupos de DE con las que comparten mayores similitudes fenotípicas. Identificar la base genética de estas condiciones permite su clasificación en función de la etiología molecular. Dilucidar la etiología subyacente en los diferentes tipos DE permite un manejo terapéutico adecuado y asesoramiento genético correcto.

En este sentido, actualmente, es una realidad la posibilidad de terapia sustitutiva con proteína EDA recombinante para el tratamiento prenatal de la DEHLX (86). Esta proteína administrada en las primeras semanas del desarrollo embrionario, a través del líquido amniótico, reestablece la función de la EDA alterada y estimula el desarrollo de dientes, glándulas sudoríparas y pelo (87).

A nivel internacional las publicaciones sobre este tema se centran en la identificación de nuevos genes o variantes en genes conocidos y la caracterización clínica de casos o series pequeñas de casos en individuos de una misma familia (88) y menos frecuentemente, estudios clínicos de cohortes de mayor tamaño, fundamentalmente asociados a DEHLX (89, 90). Hasta la fecha no se habían reportado estudios en cohortes españolas, los resultados preliminares de este trabajo con el estudio molecular de los genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* nos ha permitido caracterizar un porcentaje del 70,8% de los casos de DEH y ha supuesto la primera publicación en nuestra población (37).

No obstante, como se ha comentado anteriormente, la identificación de la patología molecular en este tipo de pacientes representa un reto difícil sobre todo en el grupo de pacientes sin variantes patogénicas en los genes referidos. Los avances recientes de secuenciación de nueva generación (NGS; Next Generation Sequencing), también conocida como secuenciación masiva en paralelo, nos permiten un abordaje integral en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias que son clínica y genéticamente heterogéneas como la DE.

Las técnicas de NGS ofrece ventajas significativas respecto a los recursos convencionales al poder obtener un número muy elevado de secuencias al mismo tiempo e incluso realizar simultáneamente estudios de muestras de diversos pacientes. Publicaciones recientes han demostrado que la secuenciación NGS, mediante el uso de diferentes paneles de genes asociados a fenotipos específicos orodentales (91), agenesia dental (92) (93), genodermatosis (94) o que incluyen todos los exones codificantes del genoma (WES, Whole Exome Sequencing) es muy útil, ya que permite la identificación de nuevos genes implicados en esta patología que no han sido descritos hasta la fecha y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades de clínica solapante.

La NGS aplicada al estudio de la DEH tiene una enorme aplicabilidad traslacional para el desarrollo de una medicina cada vez más personalizada, y supone un cambio de paradigma para el diagnóstico clínico futuro de enfermedades genéticas como las DE.

III - OBJETIVOS

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS

Dada la gran heterogeneidad genética que se ha observado en la etiología de las DE y por lo tanto la dificultad que existe, en muchos casos, para indicar un estudio molecular dirigido, se plantea la hipótesis de que bajo una entidad clínica definida como es la DEH, se pueden enmascarar otros tipos de displasias con clínica solapante que hasta la aparición de las técnicas de secuenciación masiva o NGS no ha sido fácil identificarlas. El análisis mediante un panel de genes específicos (panel NGS-ED-v.1) en combinación con un análisis clínico detallado mediante códigos HPO nos permitirá ampliar el espectro clínico y molecular de la DEH.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo principal es caracterizar clínica y molecularmente a una serie de los pacientes con diagnóstico clínico de DEH en una población española. Esta identificación nos permitirá entender la funcionalidad del gen implicado y los mecanismos patogénicos de dicha enfermedad.

Los objetivos secundarios del estudio son:

- Describir las características demográficas en una serie de pacientes con DEH de la población. española.
- Realizar una aproximación convencional al diagnóstico genético de la DEH mediante técnicas convencionales MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) y de secuenciación Sanger.
- Evaluar el rendimiento diagnóstico de un panel de genes descritos como causantes de alteraciones ectodérmicas (panel NGS ED v.1), en pacientes de nuestra población con sospecha clínica de DEH.
- Identificar los genes y sus variantes patogénicas potencialmente responsables de la DEH.

- Identificar nuevos genes implicados en la etiología de las DE con clínica solapante a la DEH.
- Caracterizar los fenotipos resultantes de las variantes de los genes identificados.
- Analizar la repercusión bioquímica-fisiológica de las variantes encontradas de acuerdo a la disfunción proteica que produzcan.
- Establecer una estrategia diagnóstica molecular eficiente a partir del análisis del rendimiento de las técnicas de estudio genético.

IV - MATERIAL Y MÉTODO

CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODO

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio multicéntrico, descriptivo transversal para caracterizar clínica y molecularmente una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de DEH y/o alteraciones en una o más estructuras derivadas del ectodermo. El periodo comprendido en la ejecución del mismo ha sido entre los meses de enero de 2014 a diciembre de 2019; este estudio fue sometido a valoración por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca que concedió su aprobación para cada uno de los procesos antes de ser iniciado (Anexo 2).

4.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio a aquellos pacientes con sospecha clínica de DEH y/o ADNS, con alteraciones en al menos dos estructuras ectodérmicas o solamente una de ellas cuando fuera hipohidrosis o agenesia dental como alteración predominante. Los pacientes que participaron proceden de diferentes hospitales de la Región de Murcia, así como de otros Servicios de Dermatología y Genética de 14 hospitales de la red nacional que prestan asistencia pública (Tabla1). Además, se contó con la colaboración de la Asociación AADE (Asociación Española de Afectados por las Displasias Ectodérmicas) desde donde se remitieron pacientes que autorizaron una completa evaluación clínica y genética para participar en dicho estudio.

Tabla 1. Hospitales colaboradores en las diferentes provincias españolas.

SERVICIO	HOSPITAL	PROVINCIA
Dermatología	Hospital Clínico de Santiago Compostela	A Coruña
Dermatología	Hospital del Mar	Barcelona
Dermatología	Hospital San Pau	Barcelona
Dermatología	Hospital Universitario de Gerona	Gerona
INGEMM	Hospital La Paz Madrid	Madrid
Genética Médica	Fundación Jiménez Díaz	Madrid
Dermatología	Hospital General Universitario Gregorio Marañón	Madrid
Dermatología	Hospital Universitario 12 de Octubre	Madrid
Dermatología	Hospital Universitario Infantil Niño Jesús	Madrid
Genética Médica/ Dermatología	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca	Murcia
Dermatología	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca	Murcia
Dermatología	Hospital Universitario Virgen de Valme	Sevilla
Dermatología	Hospital Universitario Virgen del Rocío	Sevilla
Dermatología	Hospital De Requena	Valencia
Dermatología	Hospital Clínico Universitario La Fe	Valencia
Genética Médica/ Dermatología	Hospital Universitario de Cruces	Vizcaya

4.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes de cualquier edad, sexo u origen étnico, residentes en España con diagnóstico clínico de DEH. Se incluyeron aquellos pacientes con alteración en dos estructuras derivadas del ectodermo o una, si se trataba de alteración del sudor o falta de piezas dentarias, debido al posible solapamiento fenotípico derivado de la diferente expresividad clínica. Se incluyeron también los progenitores del/a probando para determinar el origen de la anomalía.

4.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes en los que tras la valoración del cuestionario médico, presentaban características clínicas predominantes de otras DE o síndromes malformativos específicos. Estos casos no se analizaron en el presente estudio, pero sus datos clínicos fueron conservados y sus muestras de ADN se depositaron en el Biobanco en red del Nodo I de Murcia (Biobanc-Mur) del Instituto Murciano de Investigaciones Biomédicas del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca), para su inclusión en estudios posteriores, cuando así lo hubieron manifestado mediante el correspondiente consentimiento informado (Anexo 3).

4.3 LUGAR DE EJECUCIÓN

La evaluación clínica inicial de cada paciente se llevó a cabo por el equipo médico en el centro colaborador de origen. La información referente a los datos demográficos y clínicos de los afectados (varones y mujeres) y de sus familiares de riesgo se incluyó en un cuestionario clínico. Posteriormente, cada caso fue evaluado en el centro receptor para su inclusión en el estudio por un equipo clínico multidisciplinar integrado en el IMIB-Arrixaca compuesto fundamentalmente por clínicos de la Sección de Genética Médica y del Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

La implementación y optimización de las técnicas de MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification), secuenciación Sanger y Next Generation Sequencing de los genes implicados en la DEH, así como el análisis de las variantes genéticas detectadas, fueron tareas realizadas en el Centro de Bioquímica y Genética Clínica (CBGC) perteneciente a la plataforma de genómica del IMIB-Arrixaca.

El análisis estadístico se realizó en la cátedra de Genética Humana de la Universidad Católica de Murcia (UCAM) y en colaboración con el grupo de investigación de las ER (enfermedades raras) del IMIB-Arrixaca.

La conservación y depósito de muestras de ADN se realizó en el Biobanco en red del Nodo I de Murcia (Biobanc-Mur) del HCUVA, en cumplimiento de la ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

4.4 VALORACIÓN MÉDICA Y CUESTIONARIO CLÍNICO

Para la valoración y descripción clínica, se citó a cada paciente en una primera consulta médica, en la que mediante entrevista personal y revisión de la historia médica personal y familiar, se recogieron los datos demográficos y árbol genealógico; además, se recogieron las distintas variables clínicas de interés en el estudio a través del cuestionario clínico (Anexo 4) siguiendo los códigos estandarizados del HPO (Human Phenotype Ontology) (95).

Si el paciente realizó una consulta odontológica y disponía de ortopantomografía (radiografía panorámica maxilar) se solicitó una copia (para determinar el número y la posición de los dientes ausentes o todavía no erupcionados). Se tomaron fotografías de cara (de frente y perfil), dientes, cuerpo entero, manos y pies.

4.5 PROTOCOLO DE RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

De acuerdo al protocolo establecido para la recogida de muestras (Anexo 5), se recibieron dos tubos primarios de sangre periférica (de 9 ml en tubo de EDTA o 3ml si son niños pequeños):

- Tubo 1: para extracción de ADN y seguidamente el análisis molecular de los genes objeto de estudio.
- Tubo 2: para su conservación en el Biobanco en red del Nodo I de Murcia (Biobanc-Mur).

4.6 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS GENÉTICO

Las muestras de sangre periférica de los individuos que cumplían los criterios de inclusión que se han descrito, pasaron por los procesos que se describen a continuación para la caracterización genotípica:

4.6.1 Extracción y cuantificación del ADN

Se realizó extracción automatizada mediante el equipo Maxwell[®] 16 de Promega basado en el uso de partículas esféricas magnéticas. Se valoró la

absorbancia: A260/A280 y concentración mediante un nanofotómetro (Nanophotometer P330 UV/Vis P-Class).

4.6.2 Análisis mediante MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification)

En el primer nivel de estudio se les realizó a todos los pacientes un análisis específico de microdelección y/o microduplicación mediante MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) y reactivos kit-Cy5 (MRC-Holland, Amsterdam, NL) (96) empleando grupos sondas específicas de una región (salsa de sondas): para el estudio de los 4 genes prioritarios causantes de la DHE se aplicó la salsa P183 EDA-EDAR-EDARADD-WNT10A, la salsa P073-IKBKG se aplicó para la determinación de microdelecciones en *IKBKG* ante la sospecha de incontinencia pigmenti (IP) y la salsa P163-GJB-WFS1 ante la sospecha de displasia ectodérmica hidrótica o Síndrome de Clouston.

4.6.2.1 Fundamento de la técnica

La técnica de MLPA utiliza dos sondas (hemisondas) para cada región cromosómica que se quiere analizar; cada hemisonda es complementaria a la secuencia diana a analizar (21-30 nucleótidos) a la que se le ha añadido la secuencia de un cebador universal en el extremo 5'; la otra hemisonda del par también tiene una secuencia complementaria a la diana, además de un fragmento de longitud variable para que pueda registrarse durante la electroforesis capilar y la secuencia de otro cebador universal en el extremo 3'. Ambas sondas hibridan con la región diana, y se unen entre sí mediante un enzima ligasa termoestable. Con un solo par de cebadores se pueden amplificar todas las sondas que han hibridado con la región diana que se han ligado correctamente. Se utilizan varios pares de hemisondas con fragmentos de diferente longitud y que cubren una región cromosómica específica de interés, a este conjunto de sondas (-48) se les denomina salsa de sondas. De este modo podemos amplificar y cuantificar en una única reacción, numerosos fragmentos de la región específica de interés, lo que ahorra mucho tiempo y reactivos. Además, como las condiciones de reacción son las mismas, la cantidad final de producto es proporcional a la cantidad inicial de ADN, por lo que los resultados de MLPA pueden ser cuantificados, permitiendo detectar grandes deleciones y duplicaciones de un gen, es decir, variantes en

número de copias o CNV (Copy Number Variation); la imposibilidad de detectar mutaciones puntuales es una limitación de esta técnica.

El protocolo de MLPA se realizó usando 100 ng de muestra de ADN para cada paciente siguiendo las instrucciones del fabricante (MRC-Holland, Amsterdam, NL). La desnaturalización e hibridación de las sondas continuó con una reacción de ligación y amplificación mediante PCR. Un microlitro del producto amplificado fue analizado mediante un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

4.6.2.2 Interpretación de los resultados de MLPA

El análisis de los datos MLPA se desarrolló mediante el uso del programa Coffalyser.Net (v.2) (cedido por MRC-Holland). Se realizó una intranormalización para cada muestra, basada en las sondas de control incluidas en cada kit, y posteriormente cada muestra de cada paciente, se normalizó con 4 muestras controles. La disminución progresiva de señal de las sondas dentro de cada muestra en el secuenciador automático se corrigió por regresión simple. Los límites relativos normales se establecieron entre 0,75 y 1,3.

4.6.3 Secuenciación de Sanger

Simultáneamente, este primer nivel de estudio se completa con la obtención de la secuencia de todos los exones de los genes más prevalentes: *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* mediante secuenciación Sanger (GATC, Alemania) (97).

4.6.3.1 Diseño de cebadores específicos de los fragmentos de interés

Se obtuvieron las secuencias de referencias que identifican de forma única e inequívoca cada gen a secuenciar en *RefSeq* (NCBI Reference Sequence Database) (98). Se identificó de todos los exones y regiones intrónicas de los 4 genes: *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A*. Se determinó cada fragmento de ADN de interés a secuenciar (FAI) que incluyó la secuencia de todos los exones codificantes junto con los 25 nucleótidos anteriores y posteriores a cada uno de ellos localizados en las regiones intrónicas adyacentes.

El diseño de los cebadores necesarios para amplificar mediante PCR el FAI se realizó online con la ayuda del programa *Prime3 versión 4.1.0*, (accesible en

<http://primer3.ut.ee/>) (99) modificando únicamente la opción de Mispriming/Repeat Library para seleccionar la opción de genoma humano, dejando el resto de opciones tal como aparecen por defecto, procurando que el tamaño de los mismos estuviera en un rango de entre 300 y 600 pb y las temperaturas de hibridación próxima a los 60°C para favorecer la uniformidad de la reacción de PCR. A continuación, los pares de cebadores seleccionados, directos (F) y reversos (R), se chequearon por si contenían polimorfismos (SNPs) mediante el uso del visualizador genómico de la Universidad Santa Cruz de California (UCSC) (100) y activando la opción dbSNP en su versión más actualizada en ese momento (dbNSP build 146. 25/11/2015) para evitar SNPs con frecuencias iguales o superiores al 1% en la población. Posteriormente, se comprobó la secuencia y el tamaño del amplímero esperado mediante PCR *in silico* con la herramienta disponible en la UCSC. Estos cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co (San Luis, EEUU) a los que finalmente se les añadió en su extremo 5' la secuencia M13 universal, directa (F) o reversa (R) según corresponda, que posteriormente se utilizó en la reacción de secuenciación, las secuencias de los oligonucleótidos cebadores por pares (F y R), utilizados para la amplificación de cada exón (Anexo 6).

4.6.3.2 Reacción de secuenciación de Sanger (RSS) del FAI amplificado

La reacción de amplificación se realizó mediante PCR usando los cebadores diseñados y los reactivos de amplificación de Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, EEUU) con enzima AmpliTaq Gold™ 250U/5UmL y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se comprobó que los fragmentos amplificaban correctamente mediante un gel de agarosa al 2% a 150V durante 30 minutos. Al final de esta etapa se procedió al lavado con ExoProStar (Illustra™, ref: US77705V, 500uL) (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) de los fragmentos correctamente amplificados para la eliminación de los cebadores y dNTPs que no son utilizados durante la reacción de PCR y que podrían interferir en la reacción de secuenciación posterior. La reacción de secuenciación convencional (secuenciación Sanger) se realizó con el kit comercial Bright Dye™ Terminator Cycle Sequencing (Nimagen, Nijmegen, Países Bajos) que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el proceso. Los amplicones se secuenciaron en sentido directo y reverso, utilizando los mismos cebadores que en la reacción de

PCR de amplificación. La reacción consistió en 3 µl del producto de amplificación purificado, 1 µl de Bright Dye premix (incluido en el kit), 1.5 µl de 5x Sequencing Buffer (incluido en el kit), 0.5 µl de cebador directo o reverso y 4 µl de agua libre de nucleasas, con un volumen final de 10 µl. Los ciclos de secuenciación se realizaron en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystem) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante: 1 minuto de desnaturalización inicial a 96°C, 28 ciclos de síntesis (10 segundos a 96°C, 5 segundos a 57°C y 4 minutos a 60°C), refrigeración a 4°C.

Tras los ciclos de secuenciación, todo el volumen de la reacción se sometió a un paso de purificación mediante filtración por columna, en placa de 96 pocillos Optima DTR™ (EdgeBio, Gaithersburg, EEUU) siguiendo los pasos de centrifugación indicados por el fabricante (5 minutos a 850 g). Este sistema permite la eliminación de los ddNTPs marcados fluorescentemente no incorporados, dNTPs, cebadores y sales que puedan interferir en la electroforesis posterior.

La electroforesis capilar se realizó en dos secuenciadores automáticos modelo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias de las regiones de interés y zonas flanqueantes se analizaron con los programas Sequencing v5.2 y SeqScape v3.0 (Applied Biosystems) alineándolas con la versión genómica GRCh37.p13 (NC_000003.11), descargada de la base de datos GeneBank (accesibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>). La clasificación e interpretación de las variantes identificadas se hizo de acuerdo a la descripción del apartado 4.6.5.

4.6.4 Next Generation Sequencing (NGS)

4.6.4.1 Selección de genes y diseño del panel de captura NGS-ED-v.1

En un segundo nivel de estudio, se realizó un abordaje más amplio, extendiéndose el estudio a todos los genes que de algún modo se hubieran referido estar implicados en el desarrollo de las DE y/o la ADNS. Con este propósito se seleccionaron los 89 genes más prevalentes, descritos hasta la fecha y basándonos fundamentalmente en las revisiones de Visinoni, 2009 y Priolo 2009 (9, 10), también mediante consultas en diferentes bases de datos: Orphanet (101), GeneReviews® (22), National Library of Medicine (US) (102) y OMIM (103).

Se diseñó un panel de secuenciación masiva en paralelo que permite el análisis de todos los genes seleccionados en un solo test, se realizó mediante sondas de ARN de captura contra todos los exones codificantes y al menos 25pb intrónicas flanqueantes con cobertura completa de todos los genes escogidos y sus correspondientes regiones de *splicing* (panel NGS-ED-v.1). Para ello se utilizó el portal SureDesign y se obtuvieron un total 22957 sondas y 333,084 Kb (Tier 1) (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>, Agilent EEUU), (Tabla 2).

Tabla 2. Genes contenidos en el panel NGS-ED-v.1.

GEN=Alias	Displasia Ectodérmica	Fenotipo OMIM	ORPHA	Proteína	TRANSCRITO	Herencia	Locus
<i>AXIN2</i>	Oligodoncia con predisposición a cáncer colorectal	604025	300576	Inhibidor de la vía WNT	NM_004655	AD	17q24.1
<i>BRAF</i>	Síndrome cardio facio cutáneo	115150	1340	Proteínquinasa B-Raf	NM_004333	AD	7q34
<i>CDH3</i>	Degeneración macular juvenil con hipotricosis	601553	1573	Caderina 3	NM_001793	AR	16q22.1
<i>CDH3</i>	Displasia ectodérmica, ectrodactilia y distrofia macular	225280	1897	Caderina 3	NM_001793	AR	16q22.1
<i>CHUK=IKBKA=IKK1</i>	Síndrome encapsulante fetal	600664	465824	Inhibidor IKK subunidad alfa	NM_001278	AR	10q24.31
<i>CLIP2=CYLN2</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	Cytoplasmatic Linker 2	NM_032421	AD	7q11.23
<i>COL11A1</i>	Síndrome de Marshal	154780	560	Colágeno XI alfa	NM_004333	AD	1q21
<i>CTSC</i>	Síndrome Paillon-Lefevre	245000	678	Catepsina C	NM_001814	AR	1q21
<i>CTSC</i>	Síndrome Haim-Munk	245010	2342	Catepsina C	NM_001814	AR	1q21
<i>CTSK</i>	Picnodisostosis	265800	763	Catepsina K	NM_000396	AR	1q21
<i>DKC1</i>	Disqueratosis congénita ligada al X	305000	1775	Disqueratina	NM_001363	LXR	Xq28

<i>DLX3</i>	Síndrome Tricodonto-Oseo	190320	3352	DI-Homeobox 3	NM_005220	AD	17q21.3-q22
<i>DSP</i>	Síndrome de Carvajal	605676	65282	Desmoplaquina	NM_004415	AR	6p24.3
<i>DSP</i>	Síndrome piel frágil, cabello lanoso y queratodermia palmoplantar	615821	293165	Desmoplaquina	NM_004415	AD	6p24.3
<i>EDA</i>	DEH/DEA	305100	181	Ectodisplasina A	NM_001399	LXD	Xq12-q13.1
<i>EDA2R</i>	Displasia Ectodérmica LX/ Alopecia androgénica	300276	181	Receptor ED2	NM_001130442	LXD	Xq12
<i>EDAR</i>	DEH AD y AR	129490	1810	Receptor ED1	NM_0022336	AD/AR	2q11-q13
<i>EDARADD</i>	DEH AD y AR	694140/694141	248	Adaptador del receptor de la EDA	NM_0145861	AD/AR	1q42.2-q43
<i>ELN</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	Elastina	NM_000501	AD	7q11.23
<i>ERCC2</i>	Tricotiodistrofia	601675	33364	Proteína de reparación por escisión	NM_000400	AR	2q21
<i>ERCC3</i>	Tricotiodistrofia	601675	33364	Proteína de reparación por escisión	NM_00012	AR	19p13.2
<i>EVC</i>	Disostosis acrodental de Weyers	225500	952	EVC complejo ciliar subunidad 1	NM_153717	AD	4p16
<i>EVC2</i>	Disostosis acrodental de Weyers	225500	952	EVC complejo ciliar subunidad 1	NM_147127	AD	4p16.2
<i>FGFR10</i>	Síndrome lacrimo auriculo dentodigital	149730	2363	Factor crecimiento de fibroblastos 10	NM_004465	AD	4p6.3

<i>FGFR2</i>	Síndrome lacrimo auriculo dentodigital	149730	2363	Factor crecimiento de fibroblastos 2	NM_022970	AD	5p13-p12
<i>FGFR3</i>	Síndrome lacrimo auriculo dentodigital	149730	2363	Factor crecimiento de fibroblastos 3	NM_001163213	AD	5p13-p12
<i>FLNA</i>	Síndrome otopalato digital	311300	90650	Filamina A	NM_001110556	LXD	Xq28
<i>FOXP1=WHN</i>	Inmunodeficiencia células T	601705	169095	Factor de transcripción Proteína N1	NM_003593	AR	17q11-q12
<i>GATA3</i>	Hipoparatiroidismo, sordera neurosensorial y displasia renal	146255	2237	Factor de transcripción GATA 3	NM_001002295	AD	10p15
<i>GJA1</i>	Displasia oculodentodigital	164200	2710	Conexina 43	NM_000165	AD	6q11-q23.2
<i>GJB2</i>	Queratodermia palmoplantar con sordera	148350	2202	Conexina 26	NM_004004	AD	13q11-q12
<i>GJB2</i>	Queratitis, ictiosis y sordera (síndrome KID)	148210	477		NM_004004	AD	13q11-q12
<i>GJB2</i>	Ictiosis, hystrix-like con sordera (síndrome HID)	602540	477		NM_004004	AD	13q11-q12
<i>GJB6</i>	Síndrome de Clouston	129500	189	Conexina 30	NM_006783	AD	13q112
<i>GTF2H5=TTD</i>	Tricotiodistrofia	601675	33364	Factor general de transcripción II subunidad 5	NM_207118	AR	6p25.3
<i>GTF2I</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	Factor de transcripción general 2-I	NM_032999	AD	7q11.23

<i>GTF2IRD1</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	GTF2I contienen dominio de repetición 1	NM_001199207	AD	7q11.23
<i>GTF2IRD2</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	GTF2I contienen dominio de repetición 2	NM_173537	AD	7q11.23
<i>HRAS</i>	Síndrome de Costello	218040	3071	Proteína H-Ras	NM_00001242310	AD	11p15.5
<i>IFT122</i>	Displasia cráneo ectodérmica	218330/613610/ 614099/614378	1515	Proteína de transporte intraflagelar 122	NM_052985	AR	3q21.3-q22.1
<i>IFT43</i>	Displasia cráneo ectodérmica	218330/613610/ 614099/614378	1515	Proteína de transporte intraflagelar 43	NM_052873	AR	14q24.3
<i>IKBKB=IKK2</i>	Inmunodeficiencia combinada grave por deficiencia de IKK2	615592	397787	Inhibidor IKK subunidad beta	NM_001556	AR	4q24
<i>IKBKG=NEMO</i>	Síndrome OLEDAID, Incontinencia Pigmenti, Displasia Ectodérmica con inmunodeficiencia	300301/308300/ 300291	464/ 98813	Proteína del complejo IKK que interacciona con subunidad gamma	NM_001099856	LXD	Xq28
<i>INSR</i>	Hiperplasia pineal, diabetes resistente a la insulina y anomalías somáticas. Síndrome de Rabson-Mendenhall	262190	769	Receptor de la insulina	NM_000208	AR	19p13.2
<i>KCTD1</i>	SEN Síndrome (Scalp-Ear-	181270	2036	Represor	NM_001142730	AR	18q11.2

	Nipple)			transcripcional del dominio tetramerización potasio			
<i>KRAS</i>	Síndrome de Costello	218040	3071	Proteína K-Ras	NM_033360	AD	12p12.1
<i>KREMEN1</i>	Displasia Ectodérmica y agenesia dental	617392	0	Proteína transmembrana 1 con dominio kringle	NM_032045	AR	22q12.1
<i>KRT14</i>	Síndrome Naegeli-Franceschetti-Jadassohn	161000	69087	Queratina 16	NM_000526	AD	17q22-q21
<i>KRT16</i>	Paiquioniquia congénita 1 y 2	167200	2309	Queratina 16	NM_005557	AD	17q22-q21
<i>KRT17</i>	Paiquioniquia congénita 1 y 2	167210	2309	Queratina 17	NM_000422	AD	17q22-q21
<i>KRT6A</i>	Paiquioniquia congénita 1	167200	2309	Queratina 6A	NM_005554	AD	12q13
<i>KRT6B</i>	Paiquioniquia congénita 2	167210	2309	Queratina 6B	NM_005555	AD	12q13
<i>KRT81</i>	Pelo moniliforme	158000	573	Queratina B1	NM_002281	AD	12q13
<i>KRT83</i>	Pelo moniliforme	158000	573	Queratina B3	NM_002282	AD	12q13
<i>KRT85</i>	Displasia Ectodérmica pelo uña	602032	69084	Queratina B5	NM_002283	AD	12q13
<i>KRT86</i>	Pelo moniliforme	158000	573	Queratina B6	NM_001320198	AD	12q13
<i>LIMK1</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	Proteínquinasa homeodominio LIM 1	NM_002314	AD	7q11.23

<i>LRP6</i>	Agenesia dental/ Oligodoncia	603507	99798	Receptor Lipo Proteína baja densidad	NM_002336	AD	12p13.2
<i>MBTPS2</i>	Síndrome IFAP con o sin síndrome de BRESHECK	308205	2273/85284	Proteasa del factor de transcripción de membrana, sitio 2	NM_031488	LXR	Xp22.12- p22.11
<i>MEK1=MAP2K 1</i>	Síndrome cardio facio cutáneo	115150	1340	Proteinquinasa específica1 activada por mitógeno	NM_002755	AD	15q21
<i>MEK2=MAP2K 2</i>	Síndrome cardio facio cutáneo	115150	1340	Proteinquinasa específica 2 activada por mitógeno	NM_030662	AD	7q32
<i>MPLKIP=TTD N1</i>	Tricotiodistrofia no fotosensitiva	234050	33364	Proteína serina/treonina quinasa PLK1	NM_0138701	AR	7p14
<i>MSX1</i>	Síndrome de Witkop	189500	2228	Msh homeobox 1	NM_002448	AR	4p16.1
<i>NECTIN1=PVR L1</i>	Síndromes CLPED1/Rosselli- Gullienetti/ Odontotricomelico	225060/225000/ 273400	199306/325 3/ 2723	Proteína 1 receptor poliovirus	NM_002855	-	11q23-q24
<i>NECTIN4=PVR L4</i>	Síndrome ED, sindactilia 1 (EDSS1)	613573	247820	Proteína 4 receptor poliovirus	NM_030916		1q23.3
<i>NFKB1</i>	Inmunodeficiencia común variable	164011	1572	Factor nuclear kappa B subunidad 1	NM_003998	AD/AR	4q24
<i>NFKB2</i>	Inmunodeficiencia común variable	164012	1572	Factor nuclear kappa B subunidad 2	NM_001261403	AR/AR	10q24.32

<i>NOLA3=NOP10</i>	Disqueratosis congénita	224230	1775	Proteína nucleolar familia A, miembro 3	NM_018648	AR	15q14-q15
<i>OFD1</i>	Síndrome Orofaciodigital 1	311200	2750	Proteasa del centrosoma	NM_003611	LXD	Xp22.3-Xp22.2
<i>PAX9</i>	Oligodoncia	604625	99798	Factor de transcripción, Proteína paired box 9	NM_006194	AD	14q13.3
<i>PIGL</i>	Síndrome CHIME (Coloboma, corazón, ictiosis, RM y malformaciones oreja)	280000	3474	Proteína biosíntesis glicosilfosfatidilinositol	NM_004278	AR	17p11.2
<i>PKP1</i>	Epidermólisis ampollosa, síndrome fragilidad de la piel	604536	158668	Placofilina	NM_000299	AR	1q32
<i>POC1A</i>	Síndrome SOFT (baja estatura, oncodisplasia, dimorfa facial e hipotricosis)	614813	314394	Proteína centriolar	NM_001161581	AR	3p21.2
<i>PORCN</i>	Hipoplasia dermal focal, síndrome de Goltz	305600	2092	Proteína serina o-aciltransferasa. Isoformas PORCA-PORCE	NM_203475	LXD	Xp11.33
<i>RECQL4</i>	Síndrome Rotmund-Thomson	268400	2909	ADN helicasa	NM_004260	AR	8q24.3
<i>RFC2</i>	Síndrome de Williams Beuren	194050	904	Factor de replicación C2	NM_004333	AD	7q11.23
<i>RIPK4</i>	Síndrome de pterigium poplíteo	263650	1234	Proteína serina/treonina quinasa RIP	NM_004333	AR	21q22.3

<i>RMRP</i>	Hipoplasia cartílago cabello	250250	175	Endoribonucleasa mitocondrial	NM_004333	AR	9p21-p12
<i>ROGDI</i>	Síndrome Kholschutter-Tonz / ED-Sindactilia cutánea	613576	247827	Proteína homóloga ROGDI	NM_004333	AR	16p13.3
<i>SETBP1</i>	Síndrome Schinzel-Giedon	269150	798	Proteína de unión al dominio SET	NM_015559	AD	18q12.3
<i>SHH</i>	Síndrome SMMCI	147250	2162	Proteína Sonic Hedgehog	NM_000193	AD	7q36
<i>TBX3</i>	Síndrome cibital mamario	181450	3138	Factor de transcripción 3 T-Box	NM_016569	AD	12q24.1
<i>TERC</i>	Disqueratosis congénita AD	127550	1775	Telomerasa ARN	NR_001566	AR	3q21-q28
<i>TERT</i>	Disqueratosis congénita AR	127550	1775	Transcriptasa telomerasa reversa	NM_198253	AD	5p15.33
<i>TINF2</i>	Disqueratosis congénita AD	127550	1775	TRF1-Factor 2 de interacción nuclear	NM_001099274	AD	14q12
<i>TP63</i>	Síndromes: ADULT, EEC3, Extremidades y mamas, anquilobléfaron-ED, SHFM4 y Rapp-Hodgkin.	103285/ 604292/ 603543/ 106260/ 605289/ 129400	978/1896/ 69085/1071 /2440/3022	Proteína p63	NM_003722	AD	3q27
<i>TRAF6</i>	Síndrome tricornofalangico	602355	1810	Receptor TNF asociado a factor 6	NM_004620	AD	11p12
<i>TRPS1</i>	Síndrome tricornofalángico tipos I y III	190350	77258	Factor transcripción en dedo de Zinc	NM_014112	AD	8q24.12

<i>TWIST2</i>	Displasia dérmica focal facial tipo III	136500/227260	1807	Factor transcripción 2 familia Twist	NM_057179	AD	2q37.3
<i>UBR1</i>	Síndrome de Johanson Blizzard	243800	2315	Proteína ubiquitin ligasa E3 componente 1	NM_174916	AR	15q15-q21.1
<i>WDR19=IFT144</i>	Displasia cráneo ectodérmica	218330/613610/ 614099/614378	1515	Proteína de transporte intraflagelar 144	NM_025132	AR	4p14
<i>WDR35=IFT121</i>	Displasia cráneo ectodérmica	218330/613610/ 614099/614378	1515	Proteína de transporte intraflagelar 121	NM_101006657	AR	2p24.1
<i>WNT10A</i>	Displasia odonto-onico-dérmica	257980	2721	Proteína vía señalización Wnt	NM_025216	AD/AR	2q35

AD, patrón de herencia autosómico dominante; AR, patrón de herencia autosómico recesivo; LXD, patrón de herencia ligado al cromosoma X dominante; LXR, patrón de herencia ligado al cromosoma X recesivo;(-), patrón de herencia desconocido.

4.6.4.2 Preparación de la librería, secuenciación y llamada de variantes

Las regiones dianas específicas se capturaron usando el kit de enriquecimiento Panel Custom SureSelect XT (Agilent) y se prepararon las librerías (2 X 75 pb) siguiendo fielmente las instrucciones del fabricante para un equipo Miseq (Illumina, EEUU). El tamaño y la cantidad de las librerías fueron valorados antes de la hibridación con las sondas de captura y antes de formar el pool de muestras mediante electroforesis en un analizador TapeStation 4200 con las *screen tapes* D1000 y D1000HS (Agilent) respectivamente. Para realizar la carrera se utilizaron los kits de secuenciación V3 de 150 ciclos de Illumina. Los archivos fastq son posteriormente subidos a la plataforma informática Alissa, donde son analizados con la aplicación Align&Call generando los archivos de mapeo/alineamiento (bam) y de llamada de variantes (vcf).

4.6.4.4 Validación del panel y confirmación de los resultados

El panel NGS-ED-v.1 fue inicialmente validado en una cohorte de 12 pacientes afectados de DE con variantes patogénicas conocidas que habían sido diagnosticadas previamente mediante secuenciación Sanger. Los pacientes fueron seleccionados para incluir una variedad de variantes patogénicas en heterocigosis, homocigosis y hemicigosis (*missense*, *nonsense*, *indels*, y una deleción de 18pb en heterocigosis en el cromosoma X) en ocho loci diferentes para evaluar la sensibilidad del panel genético a diferentes tipos de genes. Usando nuestro algoritmo, todas las variantes patogénicas fueron detectadas de forma ciega, sin estar al tanto de la alteración molecular ni el diagnóstico clínico de cada paciente. Los resultados mostraron los siguientes datos de cobertura: cobertura media, 284X; uniformidad de cobertura, 95%; secuencia diana a 1X, 99,9%; a 10X, 99,3%; a 20X, 98,5% y a 50X, 94,3%. Se validaron todas las variantes identificadas en los 12/12 pacientes previamente caracterizados, con un valor predictivo positivo (VPP) y un valor predictivo negativo (VPN), ambos del 100%.

4.6.5 Clasificación e interpretación de las variantes identificadas

Las anotaciones de variantes se llevaron a cabo mediante el programa informático Alissa Interpret (Agilent), se priorizaron por frecuencia alélica (<2% en las bases de datos de polimorfismos de un solo nucleótido dbSNP137), 1000

genomas (104, 105), Exome Variant Server (EVS) (106) y ExAC (104) y por el efecto funcional de la misma (alterar el marco de lectura, ser variante no sinónimas o afectar al *splicing*). Otras fuentes de anotaciones utilizadas por el programa Alissa Interpret se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Fuentes de anotación del programa Alissa Interpret.

Nombre	Descripción
1000Genomes	1000 Genomes Phase1 release v3.20101123
1000GenomesPhase3	1000 Genomes Phase 3 release v5.20130502
CGA	ClinGen CNV Atlas 2018-12-11
CIViC	CIViC - Clinical Interpretations of Variants in Cancer - release 01-Dec-2018
COSMIC	COSMIC release v87
ClinVar	NCBI ClinVar 2018-12-11
DGV	Database of Genomic Variants 2016-05-15
DPOP	DECIPHER population CNVs v9.23
ESP6500	Variants in the ESP6500SI-V2 dataset of the exome sequencing project (ESP), annotated with SeattleSeqAnnotation137.
ExAC	ExAC release 0.3
HGMD Profesional	Qiagen HGMD® Professional Database 2018.4
OMIM	OMIM 2018-12-21
dbNSFP	dbNSFP v3.0b2: Database of functional predictions for non-synonymous SNPs

Los predictores bioinformáticos de patogenicidad *in silico* consultados fueron: Mutation Taster (107), SIFT (108), Polyphen2 (109), PROVEAN (110) para las variantes *missense*, *nonsense*, pequeñas inserciones y deleciones; así como Splice Finder (111) y Gene Splicer (112) en aquellas variantes que afectan al *splicing*, estos predictores se han consultado directamente o bien a través de la aplicación bioinformática Varsome (113) para la interpretación de variantes genéticas y de acceso libre en internet. Además, se consultaron las base de datos de variantes genéticas específicas para las diversas patologías hereditarias como:

Leiden Open Variation Database (LOVD v.3.0) (114) y Human Gene Mutation Database (HGMD) (115). Como secuencia de referencia se utilizó la versión GRCh37 (hg19) del genoma humano.

La llamada de las variantes se realizó empleando los siguientes parámetros:

- Profundidad de lectura mínima para detección de variantes: 30x
- Detección de variantes sobre las regiones de interés capturadas: +/- 75 pares de bases flanqueantes.
- Se anotaron como variantes de *splicing* aquellas encontradas hasta +/- 20 pares de bases desde el límite del exón-intrón.

En la identificación de variantes candidatas se excluyeron las variantes con $FA \leq 0.02$ en la base de datos Genome Aggregation Database y se recuperaron aquellas variantes reportadas en ClinVar como patogénicas o probablemente patogénicas.

Las alteraciones han sido descritas de acuerdo a recomendaciones normalizadas de la *Human Genome Variants Sequence* (HGVS) (116).

Los criterios aplicados en la clasificación de las variantes han sido los recomendados por las guías del ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) (97). En esta guía se establecen reglas para combinar evidencias disponibles que clasifican los tipos de variantes identificadas dentro de una de las siguientes categorías:

- Patogénica (VP)
- Probablemente patogénica (VPP)
- Variante de significado clínico incierto (VOUS)
- Probablemente benignas (VPB)
- Variantes benignas (VB)

Se consideraron en el estudio todas las variantes patogénicas (VP), probablemente patogénicas (VPP) o de significado clínico incierto (VOUS) identificadas que pudieran dar lugar a una clínica compatible con la que motiva el estudio solicitado en cada caso. No se consideraron las variantes benignas (VB) o probablemente benignas (VPB) en ningún caso, ni las VOUS identificadas en genes no prioritarios.

Todas las VPs y VPPs identificadas fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.6.3,

independientemente de las profundidades de lecturas; posteriormente se realizó el análisis de segregación familiar.

4.6.6 Estudio del patrón de inactivación del cromosoma X

Se realizó un estudio de inactivación del cromosoma X en todas las portadoras de variantes en genes localizados en el cromosoma X. El origen parental del cromosoma X fue determinado mediante el análisis de segregación de la repetición polimórfica del receptor AR. Este ensayo determina el número de tripletes de la repetición polimórfica CAG en el exón 1 del gen receptor de andrógenos (AR) y su estado de metilación. La digestión del ADN se efectuó con el enzima de restricción HpaII sensible a la metilación en la diana de corte de restricción de los cromosomas X activos, mientras que en los cromosomas X inactivos, la metilación de la diana de restricción lo protege de la digestión. El origen parental del cromosoma X fue determinado mediante el análisis de segregación de la repetición polimórfica del receptor AR. Un patrón de inactivación con una proporción por debajo de 80:20 se consideró aleatorio, entre 80:20 y 90:10 se clasificó como moderadamente preferencial, y mayor de 90:10 se consideró un patrón de inactivación preferencial (117).

4.7 PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO GENÉTICO

El procedimiento de estudio genético se llevó a cabo en dos niveles, en una primera instancia, todos los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión fueron analizados en la búsqueda de alteraciones en los genes clásicamente identificados en la etiología de las DEH: *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A*. El análisis se realizó simultáneamente mediante secuenciación Sanger, para detectar cambios en la secuencia de alguno de los genes, y mediante MLPA-P183, para detectar deleciones/duplicaciones (CNV) no detectadas por Sanger. Los casos que se caracterizan molecularmente en este nivel, son identificados como positivos y con ellos se establece el rendimiento del primer nivel de estudio.

Los pacientes en los que no se ha identificado una variante causal, se analizan nuevamente, ahora mediante el panel NGS-ED-v.1. Las nuevas variantes identificadas son confirmadas mediante secuenciación Sanger. Una vez asociada

la variante causal con la clínica del paciente, se establece el diagnóstico molecular y se categoriza como caso positivo y se registra para el cálculo del rendimiento del segundo nivel de estudio.

Cada paciente en los que se confirmó el diagnóstico molecular se volvió a citar en la consulta médica junto con los progenitores para analizar el origen de la variante detectada; el estudio se realizó a uno de ellos, o se amplió a ambos, dependiendo del tipo de herencia esperado; en los casos de varones con herencia ligada a X sólo se realizó el estudio materno, para el resto de casos, cuando se detectó un progenitor afecto clínicamente, el estudio únicamente se realizó en éste y en los casos en los que no se pudo establecer clínicamente al portador de la variante, se estudió a ambos progenitores.

Se realizó un estudio de inactivación del cromosoma X en todas las portadoras de variantes en genes localizados en dicho cromosoma.

Los casos en los que no se han encontrado variantes causales, se contabilizan como negativos; mientras que los casos en los que las variantes identificadas no muestran suficiente evidencia de asociación con la clínica, se contabilizan como casos no concluyentes. El procedimiento de estudio genético se resume en el algoritmo indicado en la Figura 5.

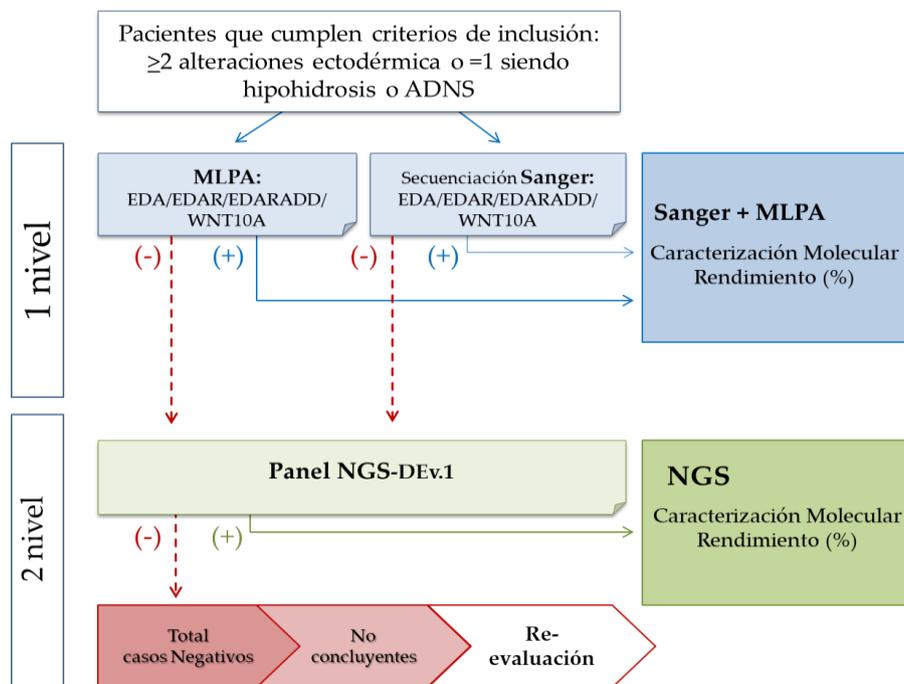


Figura 5. Procedimiento de estudio genético.

4.8 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables recogidas en el estudio proceden de los datos demográficos y fenotípicos registrados en el cuestionario clínico, así como de los resultados genéticos obtenidos en la caracterización molecular mediante el procedimiento descrito.

4.8.1 Variables demográficas-clínicas.

- Sexo: masculino o femenino.
- Edad de diagnóstico clínico definida como la edad que presenta el paciente el día que se realiza el diagnóstico clínico de sospecha; puede coincidir o no con el día de solicitud del test genético. Esta variable se considerará cuantitativa (número de años) y cualitativa (dos dimensiones: niño si menor de 18 años y adulto si mayor o igual a 18 años).
- Edad de diagnóstico molecular definida como la edad que presenta el sujeto el día que se emite el informe genético.
- Tiempo de diagnóstico molecular definido como tiempo transcurrido desde el día que se realiza el diagnóstico clínico hasta que se emite el informe genético.
- Procedencia definida como provincia del hospital que remite la muestra y el cuestionario cumplimentado.
- Diagnóstico de sospecha. Diagnóstico clínico que ha realizado el médico responsable del seguimiento del sujeto. Este profesional es el responsable de la cumplimentación del cuestionario clínico.

4.8.4 Variables del estudio de inactivación del cromosoma X.

El origen parental del cromosoma X y su grado de inactivación fue determinado mediante el análisis de segregación de la repetición polimórfica del receptor AR. Atendiendo al porcentaje de inactivación de cada uno de los cromosomas X, las portadoras se clasificaron entre las que tenían:

- Patrón aleatorio: porcentaje de inactivación de uno de los cromosoma X ≥ 80 .

- Patrón moderadamente preferencial: porcentaje de inactivación uno de los cromosomas X con valores entre 80 y 90.
- Patrón preferencial: porcentaje de inactivación de uno de los cromosomas $X \geq 90$.

4.8.2 Variables de las manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de cada sujeto se recogieron atendiendo a la terminología empleada en la Human Phenotype Ontology (HPO) que proporciona un vocabulario estandarizado de las distintas anomalías fenotípicas encontradas en la patología humana. Estas anomalías se han anotado individual y específicamente mediante transformación binaria de estos códigos HPO y se han agrupado, según el órgano o sistema funcional afectado, en las siguientes categorías que se recogen en el cuestionario clínico (Anexo 4):

- Alteraciones del sudor: anhidrosis, hipohidrosis, intolerancia al calor, hiperhidrosis palmar, fiebre recurrente (>1 episodio sin foco infeccioso) y crisis convulsivas (coincidentes con aumento de la temperatura).
- Alteraciones del pelo: ausente escaso normal (en referencia a cuero cabelludo, vello corporal, cejas, pestañas) y fino, ralo o quebradizo en general.
- Alteraciones oro-dentales: boca seca, lengua lisa, fisura labial, malformaciones labio-palatinas, ausencia de dientes y forma de dientes cónicos o microdoncia.
- Alteraciones de la piel: piel seca, dermatitis atópica, eczemas, baja sensibilidad al tacto, queratosis palmo-plantar, eritema o eritrodermia, telangiectasia facial y tumor en la piel.
- Alteraciones de las uñas: uñas pequeñas, uñas frágiles, uñas ausentes manos, uñas ausentes pies y uñas cóncavas.
- Alteraciones de la morfología craneal: frente abombada, hiperpigmentación periocular, arrugas, puente nasal aplanado, nariz pequeña y labios prominentes.
- Alteraciones de los ojos: sequedad ocular, ausencia de lágrimas en el llanto, fotofobia, úlceras corneales, quistes en los párpados y otros defectos (ceguera, miopía, etc).

- Alteraciones de la audición: cera muy abundante en los oídos, sordera neurosensorial o conductiva.
- Alteraciones neurológicas: retraso del desarrollo psicomotor, precisa logopeda, retraso global del desarrollo, mal rendimiento escolar y problemas del comportamiento.
- Alteraciones del sistema inmunitario e infecciones recurrentes.
- Alteraciones del sistema digestivo (dificultades al tragar, reflujo y vómitos)
- Alteraciones del desarrollo ponderal/sexual.
- Alteraciones de las glándulas mamarias, tiroides y timo.
- Otras alteraciones como anosmia, sangrado nasal, mamilas o polidactilia.

4.8.3 Variables de la caracterización genotípica.

Tras los resultados obtenidos en el ADN de las muestras sanguíneas procesadas y siguiendo el procedimiento de estudio establecido, las variantes de los genes identificados se interpretan según se ha descrito en el apartado 4.6.5 y se registran de la siguiente manera para el análisis del genotipo:

- Nombre del gen alterado y NM del transcrito secuenciado.
- Localización genómica: cromosoma y coordenadas según la versión genómica GRCh37 (hg19).
- Dominio de la proteína afectada mediante los predictores bioinformáticos *in silico* mencionado (apartado 4.6.5).
- Tipo de variante genética atendiendo su efecto sobre el ADN: (*missense, nonsense, frame shift deletion, in frame deletion, gross deletion*) y frecuencia alélica (gnomeD versión .1.1.1).
- Nombre de la variante génica descrita de acuerdo a recomendaciones normalizadas de la *Human Genome Variants Sequence* (HGVS).
- Publicación en base de datos variantes asociadas a morbilidad (HGMD), valores SI (referencia)/NO.
- Tipo de variante genética atendiendo a su patogenicidad. Categorización según la ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) en:- Patogénica (VP)
 - Probablemente patogénica (VPP)

- Variante de significado clínico incierto (VOUS)
- Probablemente benignas (VPB)
- Variantes benignas (VB)
- Tipo de variante genética atendiendo a su origen o heredabilidad: “*de novo*” o heredada. Entre estas, se registra el patrón de herencia para cada enfermedad.
- Diagnóstico molecular. Atendiendo al tipo de variante y gen afectado, se establece el diagnóstico genético molecular como positivo (identificada la base molecular de la enfermedad), negativos (no se observa ningún gen causal de la clínica que mostraba el paciente) y no concluyentes (no se puede establecer una relación con suficiente evidencia de que las variantes identificadas fueran causales).
- Diagnóstico de la entidad clínico-molecular. Además del diagnóstico molecular debe incluirse una valoración del fenotipo en cada caso, debido a que diferentes genes pueden originar un mismo síndrome y con un mismo gen, podemos observar diferentes identidades clínicas. De este modo, asociando el diagnóstico molecular al fenotipo de cada sujeto, se establece un subtipo molecular, una entidad clínico-molecular categorizada a través de los catálogos de enfermedades genéticas OMIM y ORPHANET.
- Vía de señalización afectada en cada caso: EDA/NF-kB, Wnt/ β -catenina, TP63 u otros mecanismos y el efecto que tienen sobre la misma.

4.8.5 Variables del rendimiento de la metodología diagnóstica.

Todas las muestras de todos los pacientes fueron analizadas en el primer nivel de estudio mediante MLPA y secuenciación Sanger. A continuación, los casos negativos o no concluyentes se analizaron, en un segundo nivel de estudio mediante NGS atendiendo al procedimiento que se describe en la Figura 5. En función de los resultados de estos análisis, cada caso fue catalogado como positivo, negativo o no concluyente para cada uno de los procedimientos. A partir de los resultados de este análisis se realizó el estudio del rendimiento de cada uno de los métodos diagnósticos.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de todas las variables en estudio. Las variables cuantitativas se describirán mediante la media y la desviación típica. Las variables cualitativas se presentarán en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas, tanto para los subgrupos formados, como para la población global.

Las variables cualitativas serán analizadas mediante test de homogeneidad basadas en la distribución Chi-cuadrado cuando los valores esperados lo hagan posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario. Para el caso de las variables cualitativas haremos un estudio de riesgos relativos si fuese posible.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado será $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos de figuras y gráficos, se realizarán con el programa SPSS v 21.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

4.10.1 Evaluación del Comité Ético de Investigación

Siguiendo las recomendaciones generales sobre investigación con seres humanos, el estudio fue sometido a la consideración del Comité de Ética de Investigación Clínica del HCUVA (Anexo 2) y fue aprobado por el mismo.

4.10.2 Consentimiento informado

Antes de llevar a cabo el procedimiento específico del estudio, se les pidió a los pacientes (testigo o representante legal) que cumplieran con los criterios de participación, que firmaran el documento de consentimiento informado, de acuerdo a la edad (menores) o análisis genético a realizar. Cada individuo fue informado de forma oral y por escrito de la metodología del estudio así como de los posibles efectos no deseables que pudieran aparecer como consecuencia de las distintas determinaciones que se realizaron. De la misma forma se informó a cada individuo o tutor correspondiente sobre el estudio y se recogió un consentimiento informado para la participación en el estudio genético y para la toma de fotografías clínicas (Anexo 7).

4.10.3 Confidencialidad de los datos

El estudio se realizó siguiendo las condiciones que deben regir los estudios de investigación con humanos que se delimitan en la Declaración de Helsinki.

Se mantuvo en todo momento una conducta profesional y de confidencialidad sobre todos los datos recogidos concernientes al estudio. Se cumplió con la legislación nacional y europea vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y Reglamento [UE] 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, el participante pudo ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual únicamente debió dirigirse a su médico del estudio.

Todas las reseñas recogidas en el cuaderno de datos fueron tratados de forma confidencial y siempre con el código del paciente, al igual que los resultados del estudio y las publicaciones derivadas del mismo no aparecerán nunca con datos personales.

Los datos de todos los cuadernos fueron introducidos en una base de datos provista de márgenes de seguridad y normas de coherencia interna que se archivó en la Sección de Genética Médica del HCUVA. Los datos de identificación de cada paciente no se incorporaron a la base de datos en la que se recogen las variables objeto de estudio. Al finalizar del estudio se procedió a su análisis estadístico.

4.10.4 Financiación del Proyecto

Este trabajo se ha desarrollado dentro de una línea de proyectos financiados por la Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación del Instituto de Salud Carlos III y co-financiado con fondos FEDER, expedientes PI14/01259 y PI17/0796 de la Acción Estratégica de Salud. Asimismo, ha colaborado en su desempeño la Asociación de Afectados por Displasia

Ectodérmica en España (a través de la campaña crowdfunding por la Displasia Ectodérmica 2015).

V – RESULTADOS

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

5.1.1 Datos demográficos, edad, sexo y procedencia

En el estudio se reclutaron 88 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Este número se incrementó hasta 224 individuos con los familiares de primer grado incluidos en el análisis de segregación. En la distribución por sexos se observó un claro predominio de los varones, 62 (70,5%) frente a mujeres, 26 (29,5%) (Tabla 4). La media de edad del diagnóstico clínico fue de $9,8 \pm 12,5$ años, con rango de edades entre 6 meses y 69 años, siendo la población mayoritaria niños (≤ 18 años, 78,4%), con una media de edad entre los niños de $5,0 \pm 4,5$ años y de $26,5 \pm 16,6$ años en la media de edad de población adulta (> 18 años, 21,6%). La edad media a la que se confirma el diagnóstico mediante el estudio genético molecular es a los $6 \pm 4,6$ años para el grupo de < 18 años y de $28,8 \pm 15,8$ años para el grupo > 18 años (Figura 6).

Tabla 4. Descripción de la población estudiada por sexo y edad

Variables	Proporción	%
Sexo		
Masculino	62/88	70,5
Femenino	26/88	29,5
Edad		
≤ 18	69/88	78,4
> 18	19/88	21,6

El tiempo de diagnóstico molecular, se alcanza en un tiempo medio de $12,2 \pm 15,3$ meses en el grupo infantil frente a un tiempo medio de $27,3 \pm 22,2$ meses en el grupo de adultos (Figura 6).

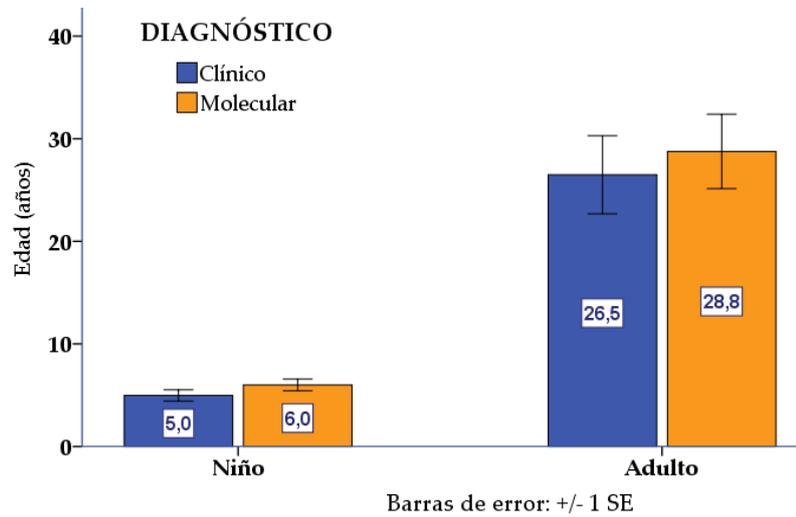


Figura 6. Edad a la que se realiza el diagnóstico clínico y molecular para cada grupo de edad.

La distribución de los casos según la localización del hospital colaborador se recoge en el siguiente mapa (Figura 7).

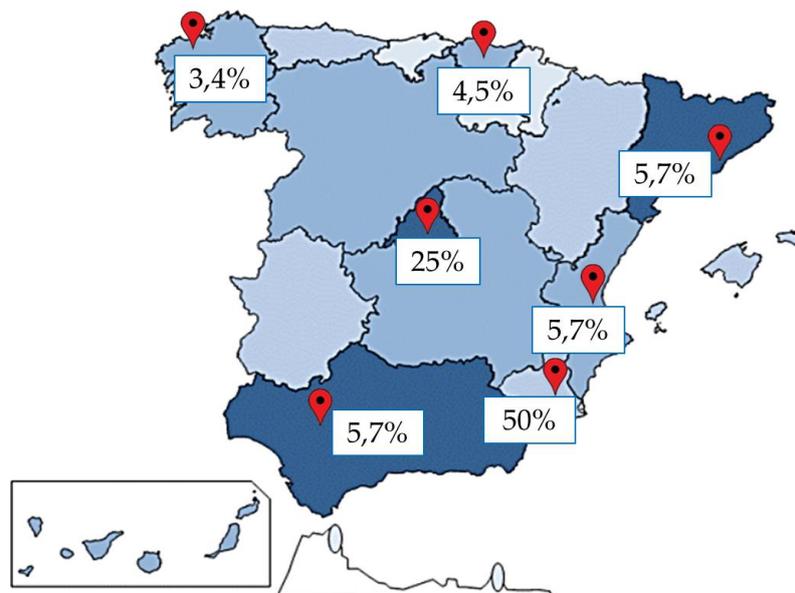


Figura 7. Distribución de los pacientes estudiados por provincias.

5.1.2 Características clínicas de los pacientes estudiados

Las anomalías fenotípicas observadas en la población de estudio, se han agrupado, según el órgano o sistema funcional afectado; la frecuencia de afectación de cada uno de estos órganos en esta serie es la siguiente: alteraciones orodentales (85,3%), alteraciones del pelo (84,0%), alteraciones de la piel (70,7%), manifestaciones craneofaciales (65,3%), alteraciones de las glándulas sudoríparas (60,5%), alteraciones oculares (41,3%), afectación de las uñas (29,3%), afectaciones digestivas (20%), infecciones recurrentes (17,3%), alteraciones neurológicas (9,3%), alteraciones del desarrollo ponderal/sexual (4,1%) y sordera (1,4%); ninguno de los pacientes presentaban alteraciones musculo-esqueléticas ni glandulares (a excepción de las glándulas sudoríparas) (Tabla 5).

En la valoración de las alteraciones orodentales, los rasgos identificativos más frecuentes fueron los dientes cónicos (70,3%) y la oligodoncia (50,7%). Entre los pacientes con alteraciones del pelo, estos manifestaron con mayor frecuencia hipotricosis (76,2%), pelo ralo (79,4%) y fino y quebradizo (76,2%). Entre las alteraciones de la piel destacaron la piel seca (75,5%) y dermatitis (60,4%). Las manifestaciones craneales más frecuente fueron la hiperpigmentación orbicular (69,4%), puente nasal plano (57,1%) y labio inferior evertido (49,0%). La hipohidrosis fue la manifestación más frecuente de alteración del sudor (93,5%) y entre las anomalías ungueales, las uñas frágiles (68,2%). Oftalmológicamente destacó la fotofobia (61,3%) y la sequedad ocular (51,6%). La dificultad para tragar (66,7%) y el reflujo gastroesofágico (60,0%) fueron las manifestaciones digestivas más frecuentes, así como el sangrado nasal (85,7%) en el grupo de otros sistemas. En cuanto a la valoración del desarrollo psicomotor, todos los casos que refirieron esta alteración, manifestaron problemas del lenguaje y requirieron logopeda (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia relativa de aparición de cada una de las alteraciones fenotípicas consideradas de forma individual y agrupada por órganos o sistemas funcionales alterados.

SISTEMA	% Alt. Sistema	ORGANO	HPO	% Alt. Organo	% Alt. Total
GLÁNDULAS SUDORÍPARAS	60,5%	Anhidrosis	HP:0000740	21,7%	11,4%
		Hipohidrosis	HP:0000966	93,5%	50,0%
		Intolerancia calor	HP:0002046	58,7%	31,8%
		Hiperhidrosis	HP:0006089	4,3%	3,4%
		Fiebre recurrente (≤3/a)	HP:0001945	20,4%	17,0%
		Crisis febriles	HP:0001250	2,2%	1,1%
PELO	84,0%	Cuero ausente	HP:0001596	3,2%	2,4%
		Cuero escaso	HP:0011357	71,4%	51,1%
		Vello ausente	HP:0001596	27,0%	19,3%
		Vello escaso	HP:001006	54,0%	38,6%
		Ceja ausente	HP:0002223	14,3%	10,2%
		Ceja escasa	HP:0045075	50,8%	44,3%
		Pestaña ausentes	HP:000561	14,3%	13,6%
		Pestañas escasas	HP:000653	61,9%	37,5%
		Pelo ralo	HP:000421	79,4%	56,8%
		Pelo fino quebradizo	HP:0002299	74,6%	53,4%
		Poca densidad	HP:0011357	76,2%	54,5%
ORODENTAL	85,3%	Boca Seca	HP:0000217	21,9%	15,9%
		Lengua lisa	HP:0030810	9,4%	6,8%
		Fisura labio sup	HP:0000204	1,6%	1,1%
		Malf. labio-palatinas	HP:0000202	1,6%	1,1%
		Ausencia dientes	HP:0000964	4,7%	3,4%

		Oligodoncia (≤ 6)	HP:0000677	54,7%	39,8%
		Hipodoncia (>6)	HP:0000668	31,3%	22,7%
		Diente Cónico	HP:0000698	70,3%	51,1%
		Microdoncia	HP:0000691	16,6%	11,4%
PIEL	70,7%	Piel seca	HP:0000958	75,5%	46,6%
		Dermatitis	HP:0000668	60,4%	36,8%
		Eczemas	HP :00064	22,6%	13,6%
		Baja sensibilidad tacto	HP:00010830	13,2%	8,0%
		Queratosis palmo-plantar	HP:0000972	24,5%	14,8%
		Eritrodermia	HP:0010783	22,6%	13,6%
		Telangiectasia facial	HP:0100585	7,4%	5,7%
		Tumor piel	HP:0008069	5,7%	3,4%
UÑAS	29,3%	Uña pequeñas	HP:0001792	27,3%	6,8%
		Uñas frágiles	HP:000180	68,2%	18,2%
		Uñas ausentes manos	HP:0001817	0,0%	14,8%
		Uñas ausentes pies	HP:0001802	0,0%	14,8%
		Coiloniquia	HP:0001598	13,6%	3,4%
		Uñas displásicas	HP:0002164	22,7%	5,7%
CRANEOFACIAL	65,3%	Frente abombada	HP:0002007	44,9%	25,0%
		Hiperpig. periocular	HP:0001106	69,4%	39,8%
		Arrugas periocular	HP:0000607	46,9%	26,1%
		Puente nasal plano	HP:0005280	57,1%	31,8%
		Nariz pequeña	HP:0003196	36,7%	20,5%
		Labio Superior evertido	HP:0010803	49,0%	27,3%
		Labio inferior evertido	HP:0000232	53,1%	29,5%

OJOS	41,3%	Sequedad ocular	HP:0001097	51,6%	18,2%
		Ausencia lagrimas	HP:0000522	16,1%	5,7%
		Fotofobia	HP:0000613	61,3%	21,6%
		Úlceras corneales	HP:0012804	3,2%	1,1%
		Quistes párpados	HP:0010604	6,5%	2,3%
AUDICIÓN	1,3%	Sordera neurosensorial	HP:0000407	100,0%	1,1%
		Sordera conductiva	HP:0000405	0,0%	0,0%
ALTERACIONES NEUROLÓGICAS	9,3%	Retraso psicomotor	HP:0025356	42,9%	3,4%
		Logopeda	HP:0000750	100,0%	8,0%
		Retraso global	HP:0001263	28,6%	2,3%
		Mal rendimiento escolar	HP:0001249	42,9%	3,4%
		Problemas de comportamiento	HP:0000708	42,9%	3,4%
INMUNIDAD, INFECCIONES Y RESPIRATORIO	17,3%	Déficit inmunológico	HP:0002721	0,0%	0,0%
		Celular	HP:0002843	0,0%	0,0%
		Humoral	HP:0011111	0,0%	1,1%
		Otitis	HP:0000403	38,5%	5,7%
		Rinitis	HP:0012384	23,1%	3,4%
		Bronquitis	HP:0002837	30,8%	8,0%
		Neumonía	HP:000652	7,7%	1,1%
		Infeción sin foco	HP:0002719	38,5%	6,8%
Asma	HP:0002099	7,7%	1,1%		
DIGESTIVO	20,0%	Voz ronca	HP:0001609	6,7%	1,1%
		Dificultad para tragar	HP:0002015	60,0%	10,2%
		Reflujo gastrico	HP:0002020	66,7%	11,4%
		Vómitos	HP:0002572	46,7%	8,0%

DESARROLLO PONDERAL/SEXUAL	4,1%	Fallo de medro	HP:0001510	100,0%	3,4%
		Retraso desarrollo sexual	HP:0000823	0,0%	0,0%
OTROS	9,3%	Anosmia	HP:0000458	0,0%	0,0%
		Sangrado nasal	HP:0000421	85,7%	8,0%
		Atelia	HP:0002561	0,0%	0,0%
		Pezones hipoplásicos	HP:0002557	14,3%	1,1%
		Pezones supernumerarios	HP:0002558	0,0%	1,1%
		Ausencia dedos	HP:0009380	0,0%	0,0%
		Polidactilia	HP:0010442	0,0%	0,0%

5.1.3 Diagnóstico de sospecha de los pacientes estudiados

En cuanto a los diagnósticos de sospecha que presentaban los pacientes en el momento de ser incluidos en el estudio, estos se agruparon en 5 categorías: DEH (58 casos), DEH que refieren sudor normal (DEH+sudor) (18 casos), síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge (SSPS) (1 caso), incontinencia pigmenti (IP) (2 casos) y agenesia dental no sindrómica (ADNS) (8 casos) (Figura 8).

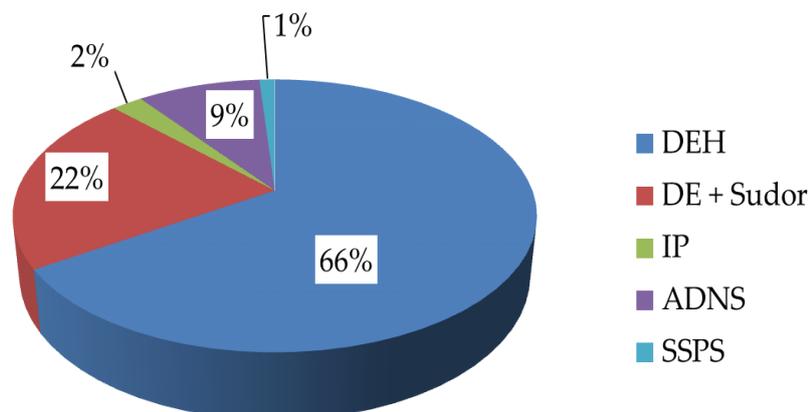


Figura 8. Frecuencia relativa de los diagnósticos de sospecha que presentaban los pacientes en el momento de ser incluidos en el estudio.

5.2 ANALISIS DE LAS VARIANTES Y GENES IDENTIFICADOS

5.2.1 Análisis de las variantes obtenidas

A través de los tres métodos de análisis genético de las muestras procesadas se han identificado un total de 108 variantes, entre ellas 85 tipos diferentes, distribuidas en un total de 24 genes. Estas variantes también se han clasificado en primarias, si están localizadas en un gen prioritario y tras la interpretación se categorizan como causantes de la enfermedad (63 variantes) y en secundarias (22 variantes), que podrían influir en el curso de la enfermedad como inductoras o atenuantes en los diferentes tipos de DE.

Las variantes clasificadas como primarias se han identificado en 12 genes candidatos con la siguiente distribución: *EDA* (34 variantes), *EDAR* (6 variantes), *WNT10A* (10 variante), *GJB6* (2 variante), *IKBKG* (1 variante), *AXIN2* (2 casos), *MSX1* (2 casos), *LRP6* (2 casos), *TP63* (1 caso), *DSP* (1 caso), *DLX3* (1 caso) y *FGFR2* (1 caso) con una asociación directa al desarrollo de algún tipo de DE.

Las variantes clasificadas como secundarias, para las que no se han descartado completamente su implicación en el desarrollo de la enfermedad, se han localizado en los genes: *AXIN2* (2 casos), *EDA* (1 variantes), *EDAR* (1 variantes), *EDARAD* (1 variantes), *LRP6* (2 casos), *NFKB2* (2 variante) *KREMEN1* (1 variante) *HRAS* (1 variante), *IKBKGP1* (1 variante), *SHH* (1 variante), *TERT* (1 variante), *KRT6A* (3 variantes), *KRT6B* (1 variante), *KRT81* (1 variante), *IFT43* (1 variante), *FGFR3* (1 variante) y *GJB2*(1 variantes). Entre las variantes secundarias se han anotado 7 de ellas categorizadas como probablemente benigna al haberse descrito en genes asociados a los diferentes tipos de DE y cuya relevancia se discutirá más adelante.

En la Tabla 6 se listan todas las variantes obtenidas y sus características.

5.2.1.1 Análisis de las variantes según su efecto

Los tipos de variantes detectadas según su efecto sobre la secuencia de nucleótidos, fueron: *missense* 54 (63,5%), *nonsense* 9 (10,6%), *gross deletion* 6 (7,0%), *in-frameshift deletion* 5 (5,9%), *frameshift deletion* 6 (7%) y *splicing* 5 (5,9%) (Figura 9).

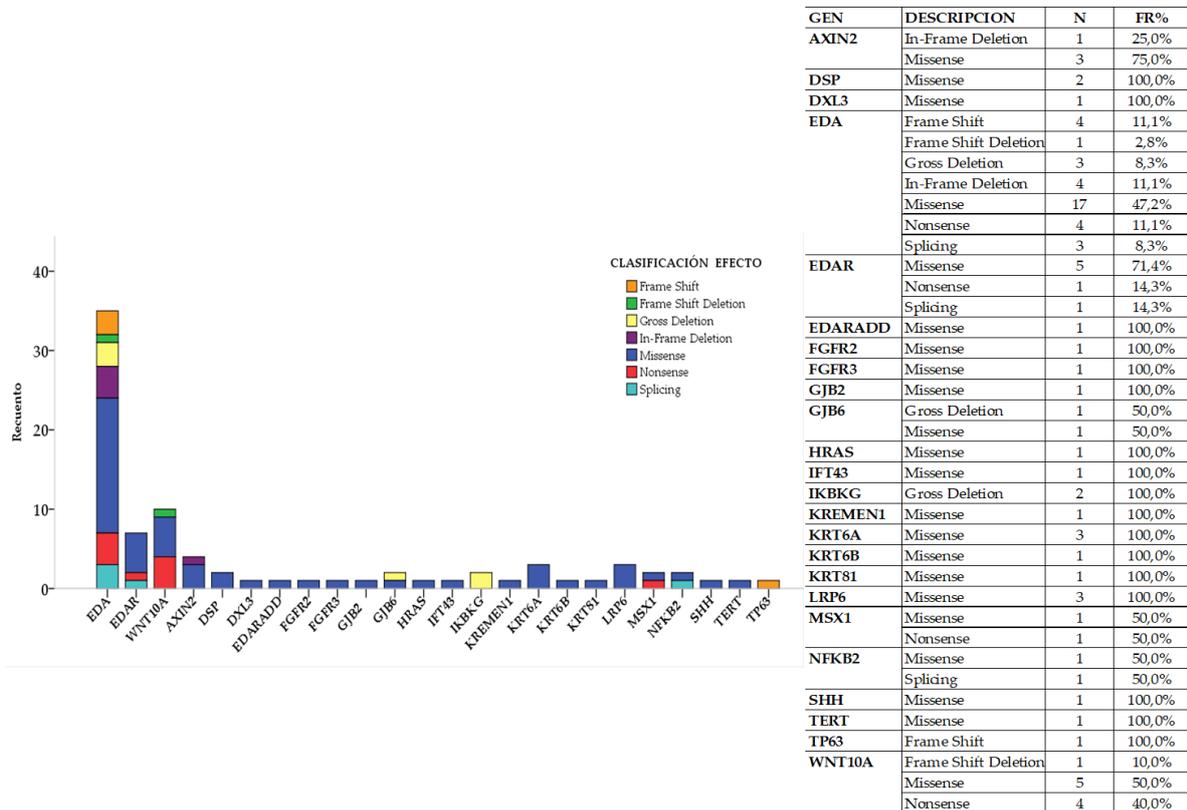
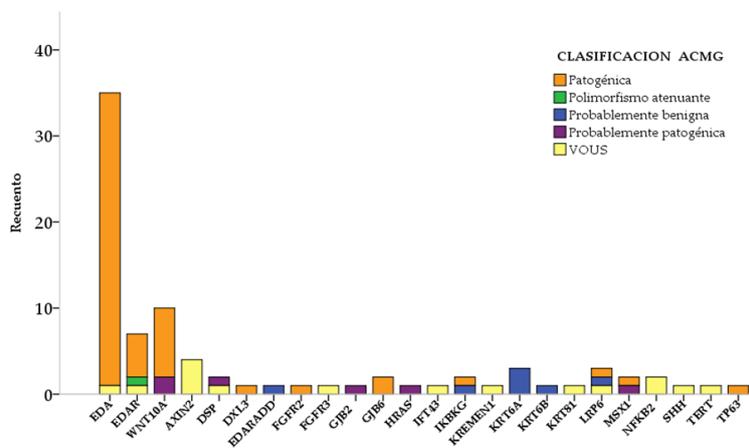


Figura 9. Distribución de los tipos de variantes detectadas, según el efecto de la variante sobre la proteína para cada uno de los genes.

5.2.1.2 *Análisis de las variantes según su patogenicidad*

El análisis de los tipos de variantes génicas atendiendo a su patogenicidad, siguiendo los criterios de la ACMG, se clasificaron en: variantes patogénicas 55 (64,7%), probablemente patogénicas 6 (7,5%), variantes de significado incierto 16 (18,8%), variantes probablemente benignas 7 (8,2%) y la variante probablemente atenuante EDAR: c.1109T>C (p.Val370Ala) en 5 casos (1,2%) (Figura 10).

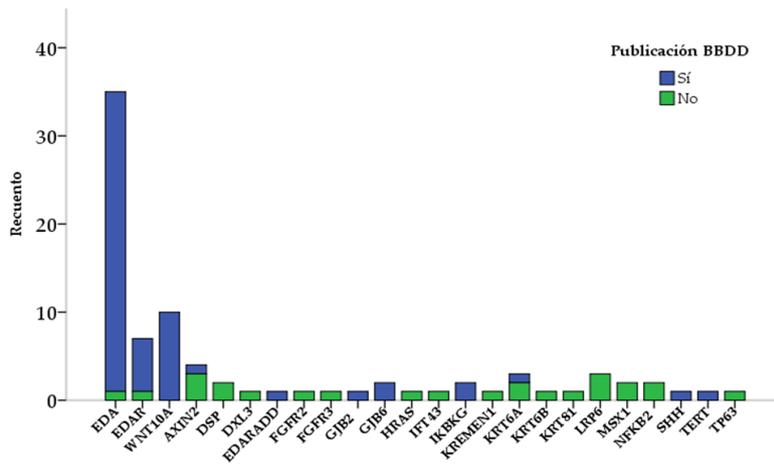


GEN	ACMG	N	FR%
AXIN2	VOUS	4	100,0%
DSP	P.patogénica	1	50,0%
	VOUS	1	50,0%
DXL3	Patogénica	1	100,0%
EDA	Patogénica	34	50,0%
	VOUS	1	50,0%
EDAR	Patogénica	5	33,3%
	Polimorfismo	1	33,3%
	VOUS	1	33,3%
EDARADD	P. benigna	1	100,0%
FGFR2	Patogénica	1	100,0%
FGFR3	VOUS	1	100,0%
GJB2	P. patogénica	1	100,0%
GJB6	Patogénica	2	100,0%
HRAS	P. patogénica	1	100,0%
IFT43	VOUS	1	100,0%
IKBK	Patogénica	1	50,0%
IKBKGP1	P. benigna	1	50,0%
KREMEN1	VOUS	1	100,0%
KRT6A	P. benigna	3	100,0%
KRT6B	P. benigna	1	100,0%
KRT81	VOUS	1	100,0%
LRP6	Patogénica	1	33,3%
	P. benigna	1	33,3%
	VOUS	1	33,3%
MSX1	Patogénica	1	50,0%
	P. patogénica	1	50,0%
NFKB2	VOUS	2	100,0%
SHH	VOUS	1	100,0%
TERT	VOUS	1	100,0%
TP63	Patogénica	1	100,0%
WNT10A	Patogénica	8	80,0%
	P. patogénica	2	20,0%

Figura 10. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su patogenicidad para cada uno de los genes.

5.2.1.3 Análisis de las variantes según su publicación.

Del total de 85 variantes distintas identificadas, 24 de ellas no estaban publicadas en bases de datos genómicas siendo identificadas como nuevas. 14 de estas eran causantes de algún tipo de DE candidatas de ser publicadas en bases de datos genómicas de morbilidad. En la Figura 11 se observa cómo se distribuyen las variantes según su publicación para cada uno de los genes.



GEN	HGMD	N	FR%
AXIN2	Sí	1	25,0%
AXIN2	No	3	75,0%
DSP	No	2	100,0%
DXL3	No	1	100,0%
EDA	Sí	34	97,1%
EDA	No	1	2,9%
EDAR	Sí	6	85,7%
EDAR	No	1	14,3%
EDARADD	Sí	1	100,0%
FGFR2	No	1	100,0%
FGFR3	No	1	100,0%
GJB2	Sí	1	100,0%
GJB6	Sí	2	100,0%
HRAS	No	1	100,0%
IFT43	No	1	100,0%
IKBKG	Sí	2	100,0%
KREMEN1	No	1	100,0%
KRT6A	Sí	1	33,3%
KRT6A	No	2	66,7%
KRT6B	No	1	100,0%
KRT81	No	1	100,0%
LRP6	No	3	100,0%
MSX1	No	2	100,0%
NFKB2	No	2	100,0%
SHH	Sí	1	100,0%
TERT	Sí	1	100,0%
TP63	No	1	100,0%
WNT10A	Sí	10	100,0%

Figura 11. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su publicación para cada uno de los genes.

5.2.1.4 *Análisis de las variantes según su heredabilidad*

El 86,6% de los pacientes analizados con diagnóstico positivo (60/66 pacientes), habían heredado su alteración génica de alguno de los progenitores. En la Figura 12 se representan la frecuencia de heredabilidad de las variantes para cada uno de los diferentes genes.

Para conocer el patrón de herencia predominante, se consiguió realizar el estudio de segregación de la variante principal en los 60 pacientes que habían heredado la alteración. El patrón de herencia obtenido fue: patrón de herencia ligada al X en el 60,6%, AD en el 24,2% y AR en el 15,2%.

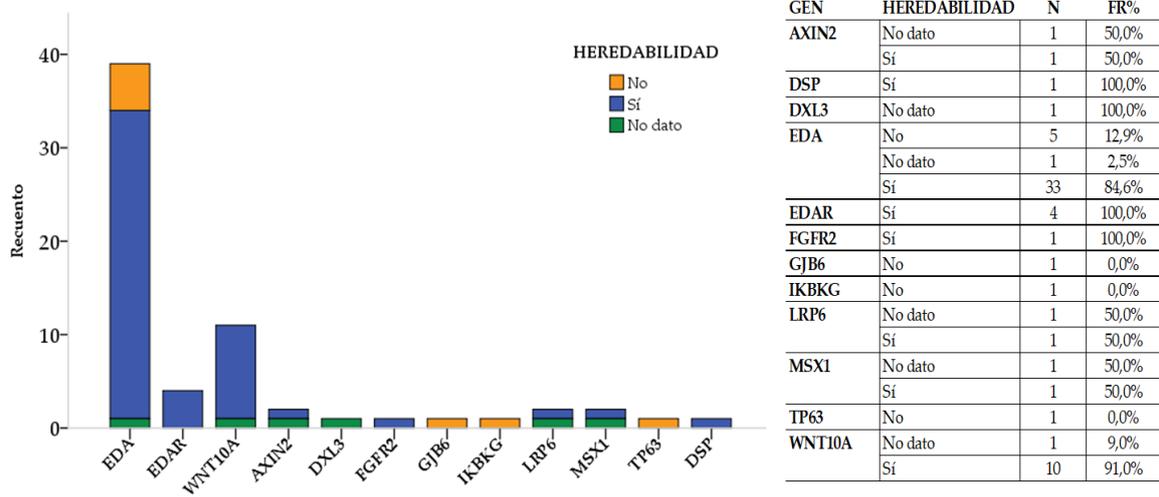


Figura 12. Distribución de los tipos de variantes detectadas según su heredabilidad para cada uno de los genes.

Tabla 6. Variantes genéticas identificadas y sus características: frecuencia alélica, tipo de variante, patogenicidad y número de veces observada.

GEN		VARIANTE	FA	DESCRIPCION	ACMG	HGMD	N
AXIN2	NM_004655.4	AXIN2: c.140A>T (p.Lys47Ile)	0,00000	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		AXIN2:c.1419_1421delCCA	0,00058	<i>In-Frame Deletion</i>	VOUS	No	1
		AXIN2:c.652C>G (p.Leu218Val)	0,00003	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		AXIN2:c.733C>T (p.Pro245Ser)	0,00064	<i>Missense</i>	VOUS	(118)	1
DSP	NM_004415.4	DSP:c.3922C>T (p.Arg1308Trp)	0,00008	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		DSP:c.643G>A (p.Glu215Lys)	0,00007	<i>Missense</i>	VPP	No	1
DXL3	NM_005220.3	DLX3:c.523A>T (p.Ile175Ser)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	No	1
EDA	NM_001399.5	EDA: c. 728_735del8 (p.Thr243LysfsTer20)	0,00000	<i>Frame Shift Deletion</i>	VP	(119)	1
		EDA:c.1027T>G (p.Tyr343Asp)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(37)	1
		EDA:c.1037G>A (p.Cys346Tyr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(21)	1
		EDA:c.1045G>A (p.Ala349Thr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(120)	3
		EDA:c.1049G>A (p.Gly350Asp)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(89)	1
		EDA:c.1069C>T (p.Arg357Trp)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(121)	1
		EDA:c.164T>C (p.Leu55Pro)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(37)	1

EDA:c.457 C>T (p.Arg153Cys)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(122)	1
EDA:c.463C>T (p.Arg155Cys)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(120)	1
EDA:c.467G>A (p.Arg156His)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(120)	2
EDA:c.516delC (p.Asn172LysfsTer108)	0,00000	<i>Frame Shift</i>	VP	(37)	1
EDA:c.546_581del36 (p.Asn185_Pro196del)	0,00000	<i>In-Frame Deletion</i>	VP	(120)	1
EDA:c.553_588del36 (p.Asn185ThrfsTer84)	0,00000	<i>In-Frame Deletion</i>	VP	(123)	1
EDA:c.572_589del18 (p.Pro191_Pro196del)	0,00000	<i>In-Frame Deletion</i>	VP	(124)	3
EDA:c.58C>T (p.Arg20Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(125)	1
EDA:c.599C>G (p.Pro200Arg)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(37)	1
EDA:c.612_629del18 (p.Ile205_Gly210del)	0,00000	<i>In-Frame Deletion</i>	VP	(121)	1
EDA:c.612delG (p.Ile205Phefs*75)	0,00000	<i>Frame Shift</i>	VP	(37)	1
EDA:c.653G>T (p.Gly218Val)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(126)	1
EDA:c.663_697del35 (p.Pro222ThrfsTer6)	0,00000	<i>Frame Shift Deletion</i>	VP	(120)	1
EDA:c.729_735del7 (p.Arg244ThrfsTer34)	0,00000	<i>Frame Shift Deletion</i>	VP	(37)	1
EDA:c.742-14T>G	0,00000	<i>Splicing</i>	VOUS	No	2

		EDA:c.760C>T (p.Gln254Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(37)	1
		EDA:c.793+1G>C (int 7)	0,00000	<i>Splicing</i>	VP	(122)	1
		EDA:c.822G>A (p.Trp274Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(122)	1
		EDA:c.866G>A (p.Arg289His)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(127)	1
		EDA:c.871G>C (p.Gly291Arg)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(37)	1
		EDA:c.880G>T (p.Glu294Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(37)	1
		EDA:c.892G>T (p.Asp298Tyr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(128)	1
		EDA:c.895G>A (p.Gly299Ser)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(120)	1
		EDA:c.895G>C (p.Gly299Arg)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(129)	1
		EDA:c.995G>A (p.Cys332Tyr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(119)	1
		EDA:del Exón 1	0,00000	<i>Gross Deletion</i>	VP	(119)	1
		EDA:del Exón 1B	0,00000	<i>Gross Deletion</i>	VP	(119)	1
		EDA:deleción gen completo	0,00000	<i>Gross Deletion</i>	VP	(130)	1
EDAR	NM_022336.4	EDAR:c.1072C>T (p.Arg358Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(120)	1
		EDAR:c.1073G>A (p.Arg358Gln)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(125)	1
		EDAR:c.1109T>C (p.Val370Ala)	0,15200	<i>Missense</i>	Polimorfismo	(131)	5
		EDAR:c.122C>T (p.Thr41Met)	0,00004	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		EDAR:c.1259G>A (p.Arg420Gln)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(120)	1
		EDAR:c.212G>A (p.Cys71Tyr)	0,00001	<i>Missense</i>	VP	(36)	1

		EDAR:c.52-2A>G (in 2)	0,00000	<i>Splicing</i>	VP	(36)	1
EDARADD	NM_145861.2	EDARADD:c.308C>T (p.Ser103Phe)	0,02150	<i>Missense</i>	VPB	(132)	6
FGFR2	NM_022970.3	FGFR2:c.2165G>C (p.Arg722Thr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	No	1
FGFR3	NM_001163213.1	FGFR3:c.932C>T (p.Ser311Phe)	0,00000	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
GJB2	NM_022970.3	GJB2:c.101T>C (p.Met34Thr)	0,00868	<i>Missense</i>	VPP	(133)	1
GJB6	NM_001110221.2	GJB6:c.263C>T (p.Ala88Val)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(134)	1
		GJB6:del Exones 1-3	0,00000	<i>Gross Deletion</i>	VP	(135)	1
HRAS	NM_176795.4	HRAS:c.175G>A (p.Ala59Thr)	0,00012	<i>Missense</i>	VPP	No	1
IFT43	NM_052873.2	IFT43:310+2T>C	0,00042	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
IKBKKG	NM_003639.4	IKBKKG:del Ex3-10	0,00000	<i>Gross Deletion</i>	VPB	(136)	1
IKBKGP1		IKBKGP1:del Ex3-10 pseudogen	0,02000	<i>Gross Deletion</i>	VPB	(137)	1
KREMEN1	NM_032045.5	KREMEN1:c.538T>C (p.Tyr180His)	0,00022	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
KRT6A	NM_005554.3	KRT6A:c.1003G>A (p.Ala335Thr)	0,01140	<i>Missense</i>	VPB	(138)	1
		KRT6A:c.1456A>G (p.Ile486Val)	0,00318	<i>Missense</i>	VPB	No	1
		KRT6A:c.418G>A (p.Val140Ile)	0,00003	<i>Missense</i>	VPB	No	1
KRT6B	NM_005555.4	KRT6B:c.1495G>A (p.Gly499Ser)	0,02610	<i>Missense</i>	VPB	(139)	1

KRT81	KRT81	KRT81:c.214G>C (p.Gly72Arg)	0,02430	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
LRP6	NM_002336.3	LRP6:c.2203G>A (p.Asp735Asn)	0,00024	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		LRP6:c.2785T>C (p.Cys929Arg)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	No	1
MSX1	NM_002448	LRP6:c.4144G>T (p.Val1382Phe)	0,00078	<i>Missense</i>	VPB	No	1
		MSX1:c.220G>A (p.Gly74Arg)	0,00000	<i>Missense</i>	VPP	No	1
NFKB2	NM_001077494.3	MSX1:c.657G>A (p.Trp219Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	No	1
		NFKB2:c.2072-3C>T	0,00110	<i>Splicing</i>	VOUS	No	1
SHH	NM_000193.4	NFKB2:c.2269C>T (p.Pro757Ser)	0,00000	<i>Missense</i>	VOUS	No	1
		SHH:c.824C>A (p.Ala275Glu)	0,00007	<i>Missense</i>	VOUS	(140)	1
TERT	NM_198253.3	TERT:c.3268G>A (p.Val1090Met)	0,00005	<i>Missense</i>	VOUS	(141)	1
TP63	NM_001114980.1	TP63:c.33dupA (p.Phe12Ilefs*2)	0,00000	<i>Frame Shift</i>	VP	No	1
WNT10A	NM_025216.3	WNT10A:c.1131C>A (p.Cys377Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(37)	1
		WNT10A:c.18_43del26 (p.Arg7AlafsTer28)	0,00000	<i>Frame Shift Deletion</i>	VP	(37)	2
		WNT10A:c.1T>A (p.Ser39Thr)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(142)	1
		WNT10A:c.27G>A (p.Trp9Ter)	0,00000	<i>Nonsense</i>	VP	(66)	1

WNT10A:c.310 C>T (p.Arg104Cys)	0,00006	<i>Missense</i>	VP	(143)	1
WNT10A:c.321 C>A (p.Cys107Ter)	0,00080	<i>Nonsense</i>	VP	(66)	2
WNT10A:c.514A>T (p.Arg172Trp)	0,00022	<i>Missense</i>	VPP	(144)	1
WNT10A:c.682T>A (p.Phe228Ile)	0,01390	<i>Missense</i>	VPP	(66)	7
WNT10A:c.742C>T (p.Arg248Ter)	0,00001	<i>Nonsense</i>	VP	(21)	1
WNT10A:c.92T>A (p.Leu31Glu)	0,00000	<i>Missense</i>	VP	(37)	1
					108

FA, frecuencia alélica según la base de datos genómica gnomAD Exomes (versión 2.1.1); ACMG, clasificación de variantes según el American College of Medical Genetics and Genomics; HGMD, descripción de la variante en la Human Gene Mutation Database; N, número de veces que se ha observado la variante.;VP, variante patogénica; VPP, variante probablemente patogénica, VPB, variante probablemente benigna; VOUS, variante de significado clínico incierto.

5.2.2 Genes identificados distribuidos por sospecha diagnóstica

El análisis genético completo de los pacientes estudiados ha llevado a la identificación de variantes primarias, patogénicas o probablemente patogénicas causantes de una DE en el 75,0% (66/88) de los casos, que eran portadores de al menos una de estas variantes en uno de los doce genes que se describen a continuación: *EDA* 59,1% (39/66), *WNT10A* 16,7% (11/66), *EDAR* 4,5% (3/66), *MSX1* 3,0% (2/66), *AXIN2* 3,0% (2/66), *LRP6* 3,0% (2/66), *DSP* 1,5% (1/66), *GJB6* 1,5% (1/66), *FGFR3* 1,5% (1/66), *DLX3* 1,5% (1/66), *IKBKKG* 1,5% (1/66) y *TP63* 1,5% (1/66).

Por otro lado, 19,3% (17/88) fueron negativos (no se observó ningún gen causal de la clínica que mostraba el paciente) y 5,7% (5/88) fueron no concluyentes (no se pudo establecer una asociación con suficiente evidencia de que las variantes identificadas fueran causales).

En este apartado se representa la distribución de estos genes sobre el diagnóstico de sospecha inicial (Tabla 7 y Figura 13) en los pacientes con diagnóstico positivo. Al realizar este análisis se puede observar que los pacientes que presentaban el diagnóstico de sospecha de DEH presentaban, mayoritariamente, una alteración en el gen *EDA* (83%); aquellos con diagnóstico de sospecha de DE+sudor, presentaban, mayoritariamente, una alteración en el gen *WNT10A* (61,5%) y aquellos con diagnóstico de ADNS, presentaban, mayoritariamente, una alteración en el gen *AXIN2* (50%). De los dos pacientes que se analizaron por diagnóstico de sospecha de Incontinencia Pigmenti, uno de ellos presentaba una alteración en el gen *IKBKKG* y el paciente con diagnóstico de sospecha de SSPS presentaba una variante en homocigosis en el gen *WNT10A*.

En los resultados obtenidos se observa que bajo el diagnóstico clínico inicial de sospecha de DEH, DE+sudor y ADNS, aparece una alta heterogeneidad genética.

Tabla 7. Frecuencia absoluta de aparición de cada uno de los genes alterados para cada uno de los diagnósticos de sospecha de los pacientes.

D.SOSPECHA INICIAL	GEN	RESULTADOS POSITIVOS
DEH	DSP	1
	EDA	39
	EDAR	4
	GJB6	1
	LRP6	1
	WNT10A	1
DE + Sudor	DXL3	1
	FGFR2	1
	LRP6	1
	MSX1	1
	TP63	1
IP	WNT10A	8
	IKBKG	1
ADNS	AXIN2	2
	MSX1	1
	WNT10A	1
SSPS	WNT10A	1
Total		66

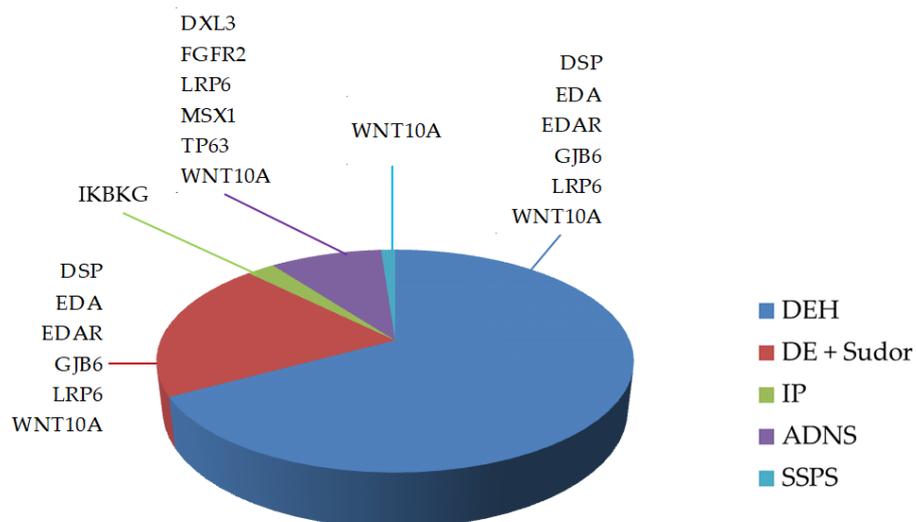


Figura 13. Genes alterados para cada uno de los diagnósticos de sospecha de los pacientes.

5.2.3 Genes identificados distribuidos por diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular establecido según los genes identificados fueron: ADNS (que engloba a los genes *EDA/WNT10A/AXIN2/LRP6*) en 10,6% de los casos (7/66), Síndrome de Clouston (*GJB6*) en 1,5% (1/66), DEHAD (genes *EDAR+LRP6*) en 1,5% (1/66), DEHAD (*EDAR*) en 1,5% (1/66), DEHAR (*EDAR*) en 4,5% (3/66), DEHLX (*EDA*) en 57,6% (38/66), Displasia Ectodérmica-Fisura Labiopalatina (*TP63*) en 1,5% (1/66), Displasia Odonto-Onico-Dérmica (*WNT10*) en 7,6% (5/66), Incontinencia Pigmenti (*IKBKG*) en 1,5%, Oligodoncia-Síndrome de Predisposición al Cáncer (*AXIN2*) en 1,5% (1/66), Síndrome de Eritroqueratodermia-Miocardopatía (*DSP*) en 1,5%(1/66), Síndrome de Witkop (*MSX1*) en 1,5% (1/66), Síndrome-Lacrimo-Aurículo-Dento-Digital *FGFR2* en 1,5% (1/66), Síndrome Schöpf-Schulz-Passarge (*WNT10A*) en 3% (2/66) y Síndrome Trico-Dento-Óseo (*DXL3*) en 1,5% (1/66) (Tabla 8 y Figura 14).

Tabla 8. Frecuencia absoluta y relativa de cada uno de los diagnósticos moleculares realizados según los genes alterados identificados.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR	GENES	CASOS POSITIVOS	Porcentaje (%)
Agnesia Dental no Sindrómica	EDA/WNT10A/AXIN2/LRP6	7	10,6
Síndrome de Clouston	GJB6	1	1,5
Displasia Ectodérmica Hipohidrótica	LRP6+EDAR	1	1,5
Displasia Ectodérmica Hipohidrótica Autosómica Dominante	EDAR	3	4,5
Displasia Ectodérmica Hipohidrótica Autosómica Recesiva	EDAR	1	1,5
Displasia Ectodérmica Hipohidrótica Ligada al Cromosoma X	EDA	38	57,6
Displasia Ectodérmica-Fisura Labiopalatina	TP63	1	1,5
Displasia Odonto-Ónico-Dérmica	WNT10A	5	7,6
Incontinencia Pigmenti	IKBKG	1	1,5
Oligodoncia-Síndrome de Predisposición al Cáncer	AXIN2	1	1,5
Síndrome de Eritroqueratodermia-Miocardiopatía	DSP	1	1,5
Síndrome de Witkop	MSX1	2	3
Síndrome Lacrimo-Aurículo-Dento-Digital	FGFR2	1	1,5
Síndrome Schöpf-Schulz-Passarge	WNT10A	2	3
Síndrome Trico-Dento-Óseo	DXL3	1	1,5
Total		66	100

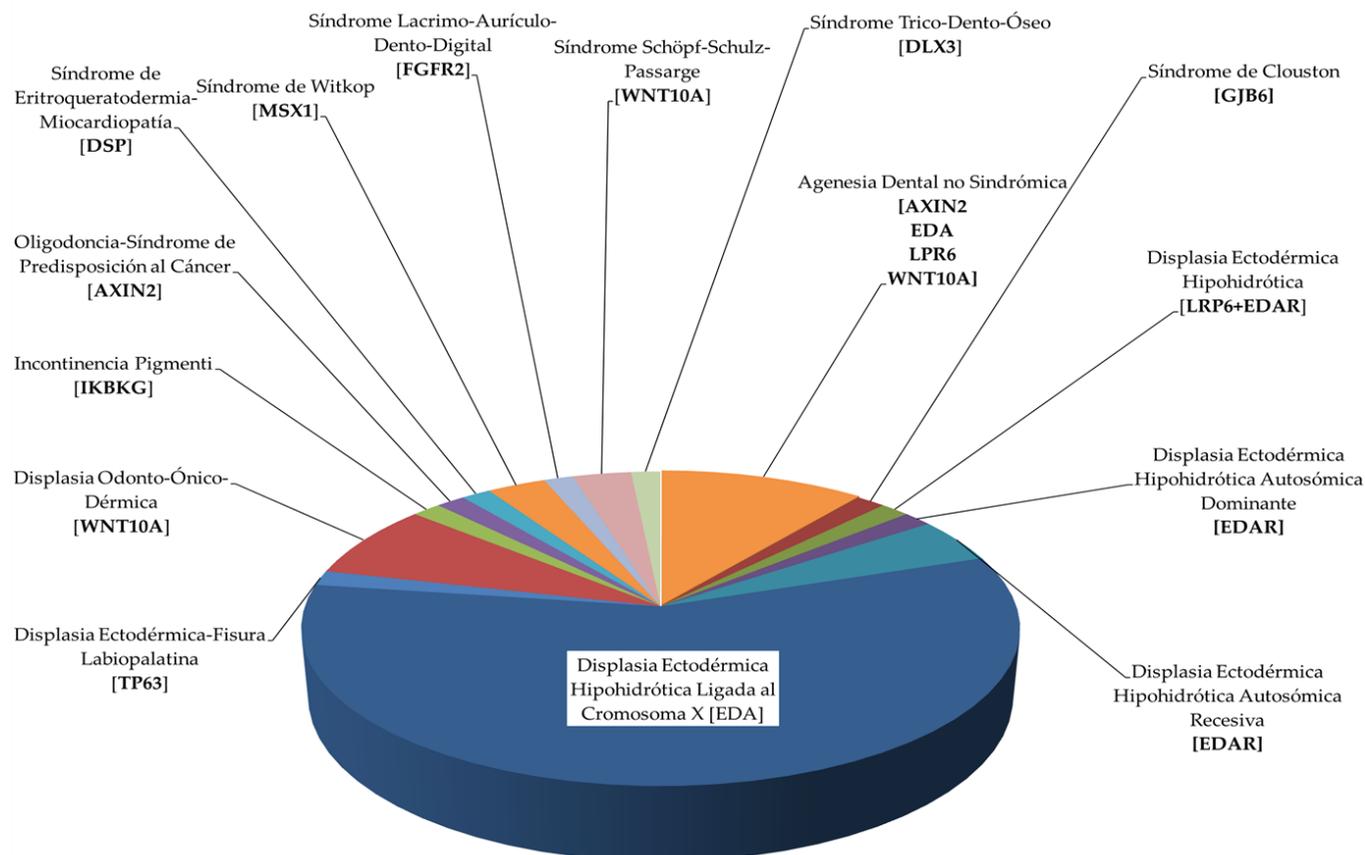


Figura 14. Genes alterados para cada uno de los diagnósticos moleculares identificados.

5.3 RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

5.3.1 Rendimiento del método de análisis según el algoritmo propuesto

Los resultados de rendimiento en el abordaje del diagnóstico molecular clásico en el primer nivel del estudio, mediante secuenciación de los 4 genes prioritarios *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A* para la DEH y el estudio de delección/duplicación mediante MLPA de los genes mencionados (además, de *IKBKG* cuando se ha sospechado IP), ha sido del 62,5% (55/88). Al ampliar el estudio molecular al segundo nivel de estudio, mediante el panel de diseño propio NGS DE v.1, el rendimiento diagnóstico se incrementa al 75% (66/88) de los casos recibidos. No se obtuvieron resultados en 19,3% de los casos (17/88). Los resultados no fueron concluyentes en 5,7% de los casos, fundamentalmente al no poderse realizar el estudio de segregación en los familiares, requisito necesario para completar la clasificación de las variantes probablemente patogénicas y/o de significado incierto obtenidas. El rendimiento del algoritmo diagnóstico obtenido en cada nivel de estudio se refleja en la Figura 15 y la Tabla 9.

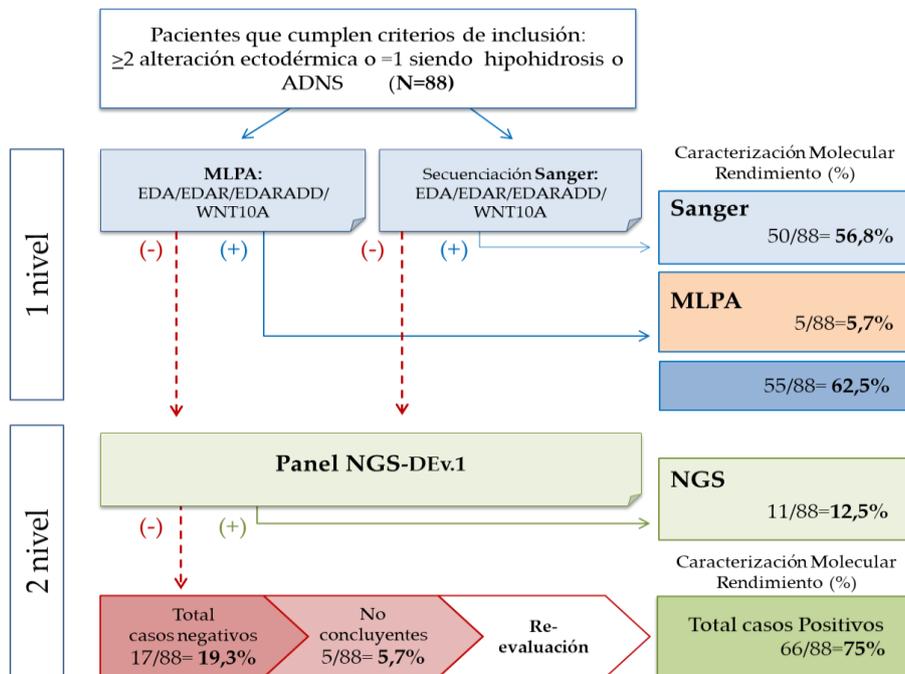


Figura 15. Algoritmo del rendimiento diagnóstico para cada nivel de estudio.

El rendimiento del estudio atendiendo al método de análisis empleado, revela un incremento del 12,5% entre el abordaje mediante secuenciación Sanger y la secuenciación mediante el panel NGS ED v.1.

Atendiendo únicamente a los pacientes que presentan un diagnóstico molecular positivo, se observa un incremento en la detección de casos positivos del 75,7% al 92,4% en favor de la secuenciación mediante NGS.

Tabla 9. Rendimiento del estudio atendiendo al método de análisis.

	Casos	MÉTODO	Casos	% POSITIVOS	% TOTAL
POSITIVOS	66	SANGER	50	75,7%	56,8%
		MLPA	5	7,6%	5,7%
		Panel NGS-ED v.1	61	92,4%	69,3%
NO CONCLUYENTES	5				5,7%
NEGATIVOS	17				19,3%

5.3.2 Rendimiento del método de análisis atendiendo al diagnóstico clínico de sospecha

El rendimiento del método de análisis utilizado según el diagnóstico clínico inicial de sospecha que se ha alcanzado para el primer nivel de estudio, muestra los siguientes valores: 77,6% en las DEH, 36,8% en las DE+sudor, 12,5% en la ADNS, 50% en el caso indicado como IP y 100% en el caso indicado como SSPS. En el segundo nivel de estudio, mediante el panel NGS ED v.1, el rendimiento total y para cada grupo se ha incrementado a 81,1% en las DEH, 68,4% en las DE+sudor y 50% en la ADNS; estos resultados se expresan en la Tabla 10. Si comparamos estas distribuciones se aprecia mayor rentabilidad diagnóstica mediante el panel para los diagnósticos de sospecha de DE+sudor y ADNS ($p < 0,001$; $\chi^2 = 34,68$). Es decir, el rendimiento diagnóstico mediante MLPA y secuenciación Sanger (primer nivel) para los pacientes que acuden con diagnóstico de sospecha de DE+sudor y ADNS es estadísticamente inferior al compararlo con el rendimiento de los pacientes que acuden con DEH, pero al considerar ambos niveles (rendimiento global), las diferencias, desde un punto de vista estadístico, desaparecen y se podría confirmar que el rendimiento global es

el mismo en todos los grupos de pacientes atendiendo al diagnóstico de sospecha cuando se emplean todas las técnicas diagnósticas.

Tabla 10. Rendimiento de cada método de análisis para cada grupo de diagnóstico de sospecha

		MÉTODO	DEH	DE +Sudor	SSPS	IP	ADNS
POSITIVOS	<i>1er Nivel</i>	SANGER	41 70,7%	7 36,8%	1 100,0%	0 0,0%	1 12,5%
		MLPA	4 6,90%	0 0	0 0	1 50%	0 0
	<i>2º Nivel</i>	Panel NGS-ED v.1	41+2 74,1%	7+6 68,4%	1+0 100%	0+0 0	1+3 50%
		Total positivos (%)	81,0%	68,4%	100%	50%	50%
NO CONCLUYENTES		3 5,2%	1 5,3%	0 0,0%	0 0,0%	1 12,5%	
NEGATIVOS		8 13,8%	5 26,3	0 0	1 50	3 37,50%	
		Total casos (n)	58	19	1	2	8

La representación gráfica del rendimiento del método de análisis sobre el diagnóstico clínico de sospecha queda reflejada en la Figura 16.

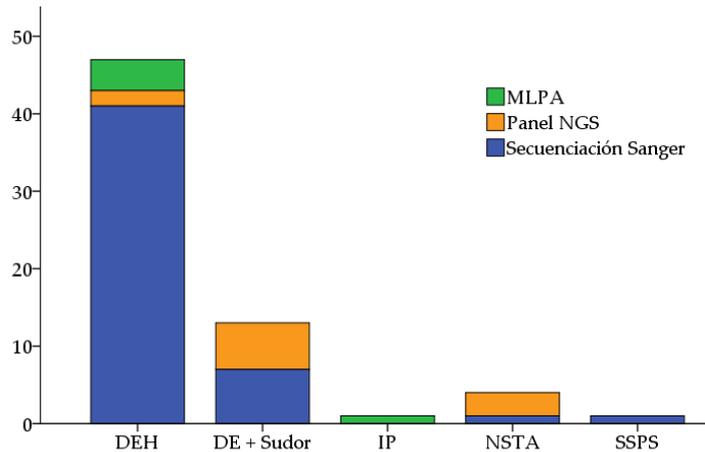


Figura 16. Rendimiento del método sobre el diagnóstico clínico de sospecha.

5.3.3 Rendimiento del método de análisis por diagnóstico molecular.

El rendimiento de cada uno de los métodos de análisis para cada uno de los diagnósticos moleculares puede observarse en la Tabla 11.

La limitación que presenta el análisis mediante secuenciación Sanger al analizar los cuatro genes que se han abordado en el primer nivel (incapacidad de esta técnica de detectar CNV) requiere completar este primer nivel con el análisis mediante MLPA. De esta manera, el análisis del rendimiento del protocolo utilizado (considerando los 66 casos con diagnóstico molecular positivo), revela que las técnicas de secuenciación completa del cada gen mediante secuenciación (Sanger o NGS), permiten alcanzar el diagnóstico del 100% en la mayoría de los grupos; no obstante, se ha requerido otra técnica como el MLPA para detectar variantes en el número de copias (CNV), en el 8% de las DEH (con grandes deleciones en el exón 1 del gen *EDA*), en un caso de IP que presentó una deleción de los exones 4-10 del gen *IKBKG* y en un caso de Síndrome de Clouston, portador de dos variantes en el gen *GJB6*, una deleción de los exones 2-4 del gen en el alelo materno y una variante *missense* en la secuencia del alelo paterno;

requiriendo este último caso de dos técnicas diferentes para alcanzar el diagnóstico molecular definitivo. Estos datos de rendimiento se describen en la Tabla 11 y se representan en la Figura 17.

Tabla 11. Rendimiento de cada uno de los métodos de análisis para cada uno de los diagnósticos moleculares.

DIAGNOSTICO MOLECULAR	MÉTODO	N	%
Agenesia dental selectiva	Secuenciación Sanger	4	57,10%
	Panel NGS	3	42,90%
Displasia ectodérmica + Sudor	MLPA+Panel NGS (*)	1	100%
Displasia ectodérmica hipohidrótica (+ LRP6)	Panel NGS	1	100%
Displasia ectodérmica hipohidrótica autosómica dominante	Secuenciación Sanger	3	100%
Displasia ectodérmica hipohidrótica autosómica recesiva	Secuenciación Sanger	1	100%
Displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al cromosoma X	Secuenciación Sanger	35	92%
	MLPA	3	8%
Displasia ectodérmica-fisura labiopalatina	Panel NGS	1	100%
Displasia odonto-ónico-dérmica	Secuenciación Sanger	5	100%
Incontinencia Pigmenti	MLPA	1	100%
Oligodoncia-síndrome de predisposición al cáncer	Panel NGS	1	100%
Síndrome de eritroqueratodermia-miocardopatía	Panel NGS	1	100%
Síndrome de Witkop	Panel NGS	2	100%
Síndrome lacrimo-aurículo-dento-digital	Panel NGS	1	100%
Síndrome Schöpf-Schulz-Passarge	Secuenciación Sanger	2	100%
Síndrome trico-dento-óseo	Panel NGS	1	100%
Total		66	

(*) Diagnóstico molecular que requirió ambas técnicas.

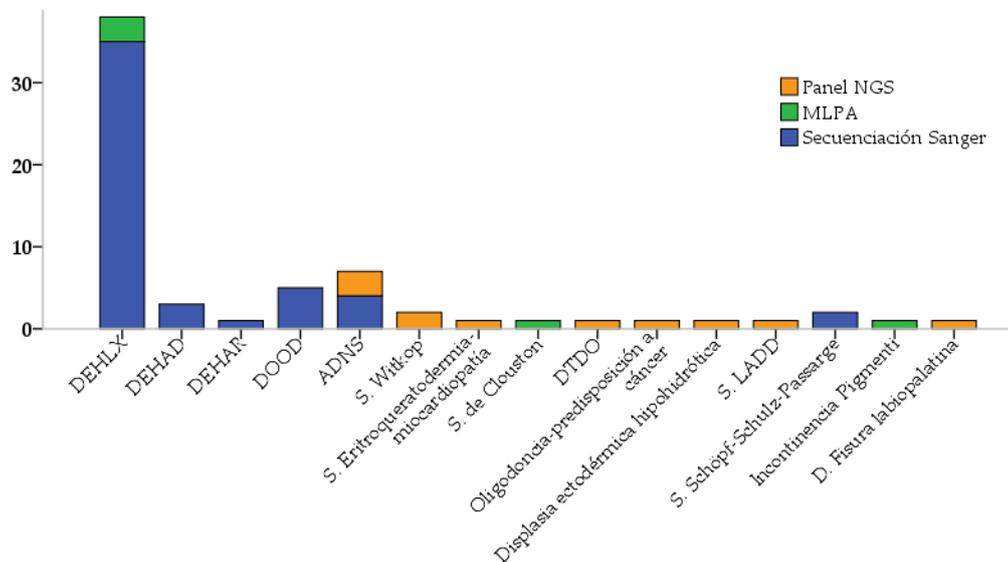


Figura 17. Rendimiento de cada uno de los métodos de análisis para cada uno de los diagnósticos moleculares.

5.3.4 Análisis de los casos no concluyentes

Entre los casos analizados, 5 de ellos fueron no concluyentes, un 5,7% de los casos. Los genes con variantes identificadas en estos casos fueron: *EDA*, *AXIN2*, *DSP* y *GJB2*. Los motivos que no permitieron categorizar la variante y concluir el diagnóstico molecular se debieron a la falta de muestras de alguno de los progenitores para realizar el estudio de segregación y los genes. En la variante de *splicing EDA*: c.742-14T>G no se pudo realizar un análisis del ARN mensajero al no poder disponer de una segunda muestra adecuada para este propósito.

5.4 ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Se realizó un análisis de correlación entre las variables clínicas reflejadas en los cuestionarios y los genes identificados

5.4.1 Análisis de las variables clínicas y los genes identificados.

5.4.1.1 Genes implicados en cada una de las alteraciones clínicas.

La frecuencia de aparición de alteraciones en cada uno de los órganos o sistemas funcionales presenta igual distribución para cada uno de los genes alterados en los pacientes con diagnóstico positivo, excepto para las alteraciones de sudor ($p < 0,001$; $\chi^2 = 32,01$), alteraciones del pelo ($p < 0,04$; $\chi^2 = 18,84$), alteraciones de la piel ($p < 0,014$; $\chi^2 = 22,17$), alteraciones craneofaciales ($p < 0,03$; $\chi^2 = 19,94$) y alteraciones de las uñas ($p < 0,05$; $\chi^2 = 15,9$) En las Figuras de la 18 a 29 se observan la frecuencia absoluta de aparición de alteración para cada uno de los sistemas funcionales por cada uno de los genes. Estas diferencias en cada uno de los sistemas funcionales u órganos, se observan del siguiente modo:

- Alteraciones del sudor. Los pacientes que presentan alteración en el gen *EDA* presentan más frecuentemente alteraciones en el sudor (90,3%) mientras que los pacientes que presentan alteraciones en el gen *WNT10A* no suele manifestar alteraciones en el sudor (20%). También se han obtenido diferencias significativas en el gen *AXIN2* (ausencia de alteraciones del sudor en el 100% de los pacientes) pero dada su escasa frecuencia de aparición este resultado debe ser interpretado con mucha cautela.
- Alteraciones del pelo. Se han obtenido diferencias significativas en el gen *FGFR2* (ausencia de alteraciones del pelo en el 100% de los pacientes) pero dada su escasa frecuencia de aparición este resultado debe ser interpretado con mucha cautela.
- Alteraciones de la piel. Los pacientes que presentan alteración en el gen *EDA* presentan más frecuentemente alteraciones en la piel (86,7%) mientras que los pacientes que presentan alteraciones en el gen *AXIN2* no suele manifestar alteraciones en la piel (0%); este último resultado debe ser interpretado con mucha cautela dada la escasa frecuencia de aparición de este gen en nuestra muestra.
- Alteraciones craneofaciales. Los pacientes que presentan alteración en el gen *EDA* presentan más frecuentemente alteraciones craneofaciales (76,7%) mientras que los pacientes que presentan alteraciones en el gen *AXIN2* no suele manifestar este tipo de alteraciones (0%); este último resultado debe ser interpretado con mucha cautela dada la escasa frecuencia de aparición de este gen en nuestra muestra.
- Alteraciones en las uñas. Los pacientes que presentan alteración en este gen *WNT10A* suelen presentar más frecuentemente que el resto alteraciones en las uñas (70%).

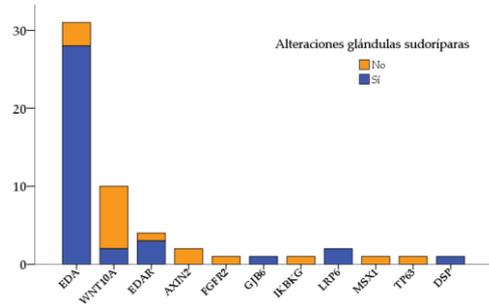


Figura 18. Frecuencia de aparición de alteraciones en el sudor en la cohorte de estudio según el gen implicado.

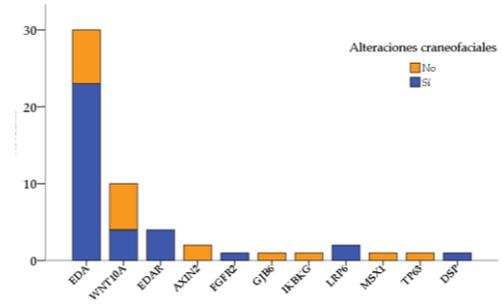


Figura 21. Frecuencia de aparición de alteraciones craneofaciales en la cohorte de estudio según el gen implicado.

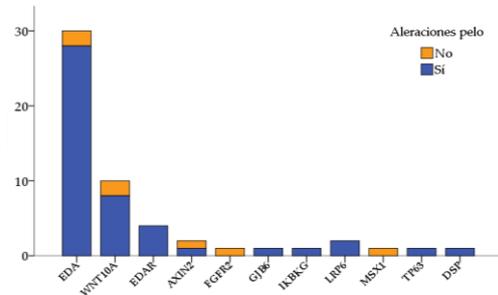


Figura 19. Frecuencia de aparición de la alteración del pelo en la cohorte de estudio según el gen implicado.

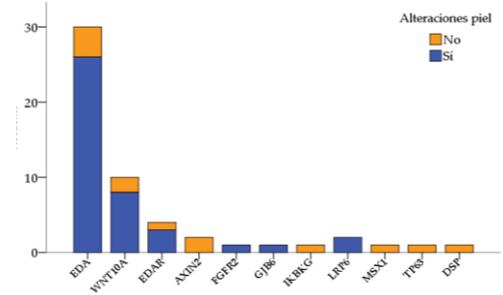


Figura 22. Frecuencia de aparición de alteraciones en la piel en la cohorte de estudio según el gen implicado.

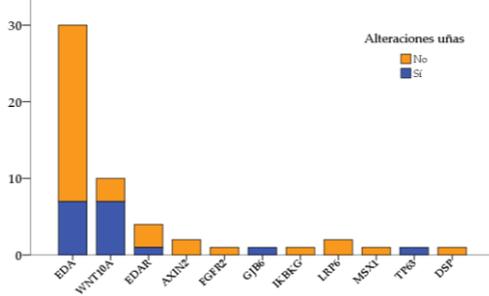


Figura 20. Frecuencia de aparición de alteraciones en las uñas en la cohorte de estudio según el gen implicado.

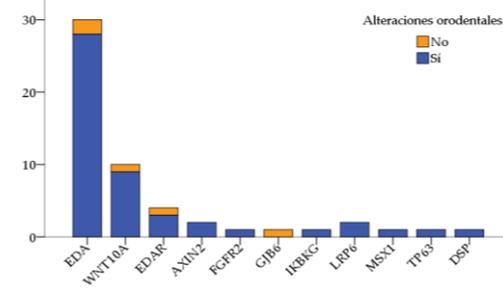


Figura 23. Frecuencia de aparición de alteraciones orodentales en la cohorte de estudio según el gen implicado.

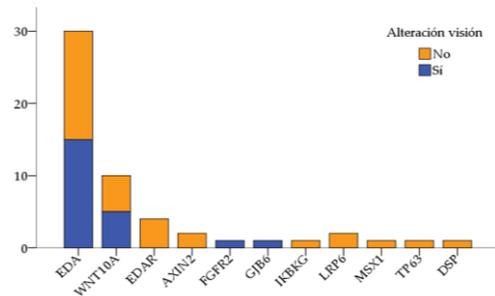


Figura 24. Frecuencia de aparición de alteraciones en la visión en la cohorte de estudio según el gen implicado.

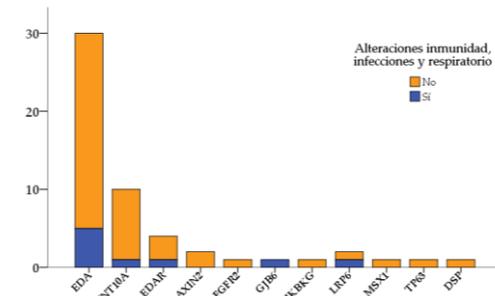


Figura 27. Frecuencia de aparición de alteraciones en la inmunidad, infecciones y sistema respiratorios en la cohorte de estudio según el gen implicado.

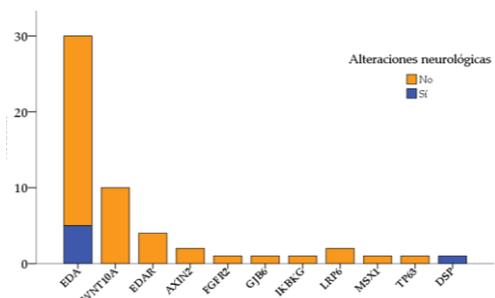


Figura 25. Frecuencia de aparición de alteraciones en las alteraciones neurológicas en la cohorte de estudio según el gen implicado.

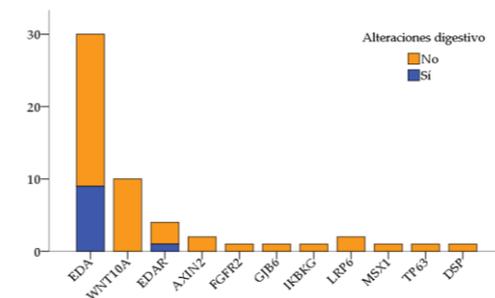


Figura 28. Frecuencia de aparición de alteraciones en el sistema digestivo en la cohorte de estudio según el gen implicado.

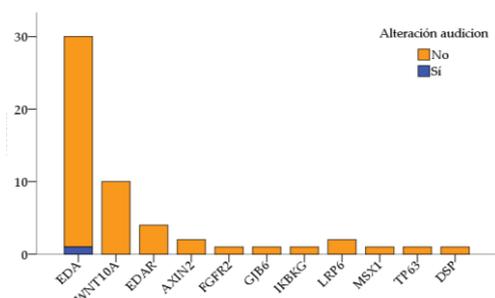


Figura 26. Frecuencia de aparición de alteraciones en la audición en la cohorte de estudio según el gen implicado.

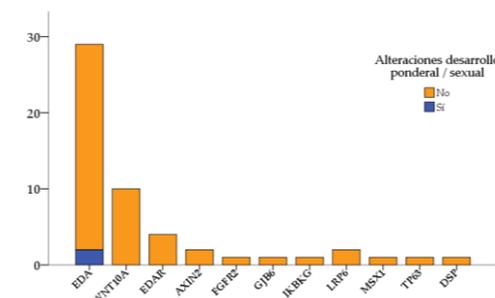


Figura 29. Frecuencia de aparición de alteraciones del desarrollo ponderal/sexual en la cohorte de estudio según el gen implicado.

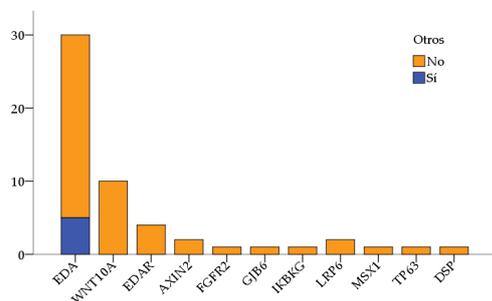


Figura 30. Frecuencia de aparición de otras alteraciones en la cohorte de estudio según el gen implicado.

5.4.1.2. Distribución clínica para cada uno de los genes.

En este apartado se han configurado los perfiles clínicos de cada grupo de pacientes que presentan un mismo gen alterado (sobre el total de los 66 casos positivos) (Figura 30-41). En cada figura se ha representado la frecuencia relativa de aparición de cada una de las alteraciones para cada grupo de pacientes que presentan un mismo gen alterado y se compara con la frecuencia de aparición de estas mismas alteraciones considerando a los pacientes de forma global.

Dada la elevada tasa de aparición del gen *EDA*, para este gen se ha realizado una comparación en la frecuencia de aparición de alteraciones entre los hombres y las mujeres. No se han observado diferencias significativas entre las frecuencias de distribución.

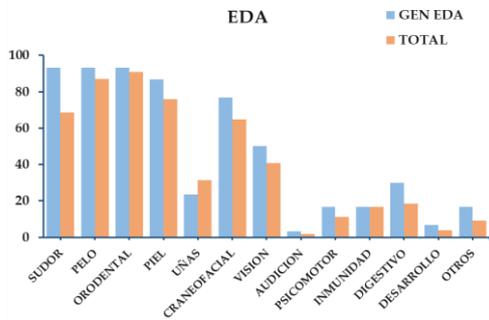


Figura 31. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *EDA*.

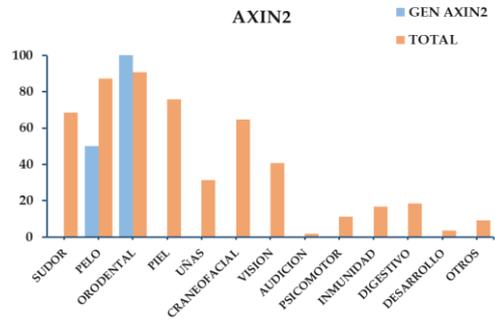


Figura 34. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *AXIN2*.

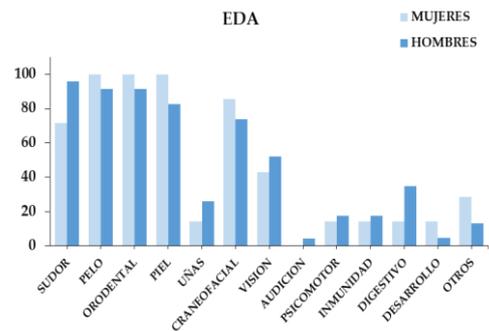


Figura 32. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo para el gen *EDA* entre ambos sexos.

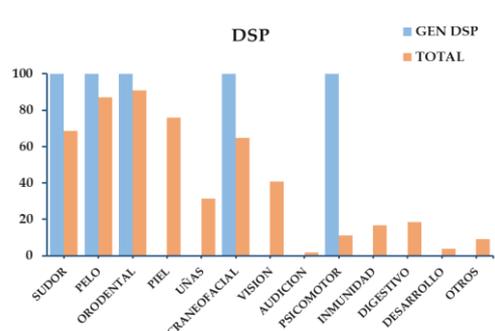


Figura 35. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *DSP*.

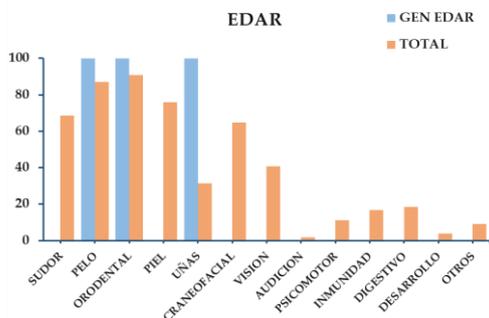


Figura 33. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *EDAR*.

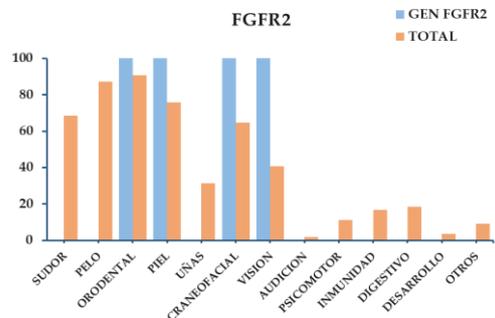


Figura 36. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *FGFR2*.

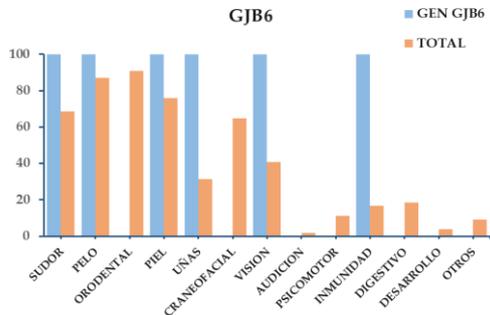


Figura 37. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *GJB6*.

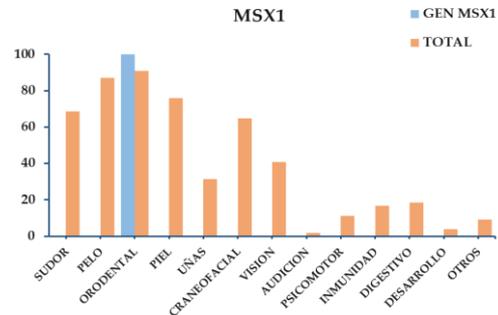


Figura 40. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *MSX1*.

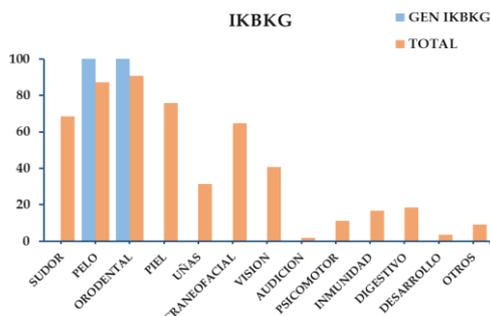


Figura 38 . Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *IKBK G*.

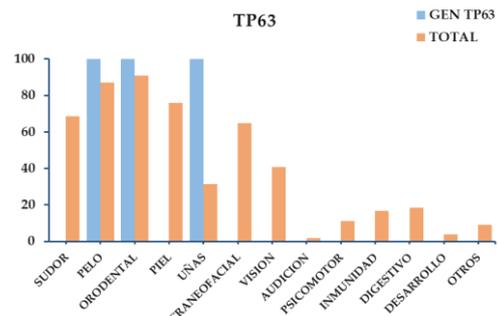


Figura 41. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *TP63*.

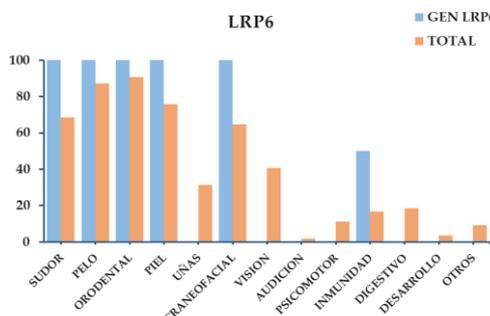


Figura 39. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *LRP6*.

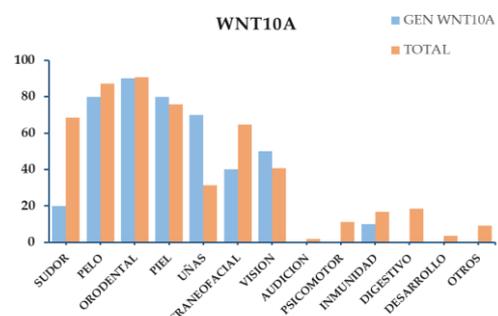


Figura 42. Distribución clínica de los pacientes con resultado positivo considerados de forma global y la distribución clínica de los pacientes con alteración del gen *WNT10A*.

Además, se ha representado el perfil clínico entre los pacientes con resultados negativos (sin variantes detectadas) y se ha comparado con el perfil clínico de los pacientes con diagnóstico molecular positivo. La comparación pone de manifiesto que ambas distribuciones o perfiles son similares, y nos indica que entre el 19,3% de los casos negativos, encontramos pacientes con clínica altamente sugestiva de DEH, pero con potenciales alteraciones en otros genes no identificados en este trabajo que afectan al sudor, piel y dientes (Figuras 43-44).

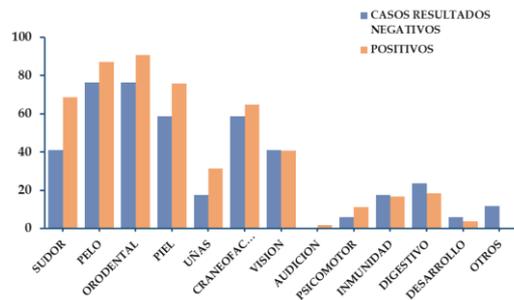


Figura 43. Distribución del perfil clínico de los pacientes con resultado positivo frente a la distribución del perfil clínico de los pacientes con resultado negativo.

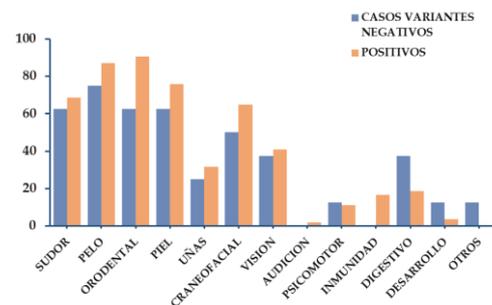


Figura 44. Distribución del perfil clínico asociado al grupo de variantes causales (VOUS, VPP y VP) frente al perfil clínico del grupo en los que no se han detectado variantes.

5.4.2 Estudio de inactivación del cromosoma X en DE ligadas al X

Para establecer si la inactivación del cromosoma X puede haber influido en las manifestaciones clínicas de las pacientes portadoras o si existe algún grado de correlación entre el grado de inactivación y el fenotipo, se realizó un estudio de inactivación (metilación) de dicho cromosoma en las 8 niñas portadoras de variantes en *EDA*, 1 niña portadora de una deleción patogénica en *IKBKG* y otra portadora de una deleción en la misma región, pero que afectaba al pseudogen *IKBKGP1*, considerado polimorfismo ($FA \geq 0.02$).

El análisis de inactivación del cromosoma X fue informativo en 7 de las 8 mujeres portadoras de variantes en *EDA* y reveló un patrón aleatorio entre cada par de cromosoma X en 6 de las 7 mujeres y un patrón moderadamente preferencial en una de ellas. Esto indica que el fenotipo de la DEH en las portadoras de *EDA* no se correlacionó con el patrón de inactivación del cromosoma X. Contrariamente, el patrón de inactivación fue claramente preferencial (100%) en el cromosoma X portador de la variante patogénica en *IKBKG* (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados del estudio de inactivación del cromosoma X para cada una de las mujeres portadoras de alteraciones en genes localizados en dicho cromosoma.

ID	Caso	Variante	Clasificación				Inactivación		Diagnóstico clínico
			ACMG	A1pb	A2pb	A1(%)	A2 (%)	Cromosoma X	
10	Probando	EDA: deleción gen	Patogénica	270	270	NI	NI	-	DEH
10	emela monocigo	EDA: deleción gen	Patogénica	270	270	NI	NI	-	DEH
11	Probando	EDA: c.729_738del7	Patogénica	286	290	74,40%	25,60%	<i>Aleatoria</i>	DEH
11	Hermana	EDA: c.729_738del7	Patogénica	286	290	91,60%	9,40%	<i>Preferencial</i>	DEH
15	Probando	EDA: c.871G>C	Patogénica	274	277(*)	60%	40%(*)	<i>Aleatoria</i>	DEH
15	Madre	EDA: c.871G>C	Patogénica	277(*)	280	61,6%(*)	38,40%	<i>Aleatoria</i>	Normal
16	Probando	EDA: c.880G>T	Patogénica	268	270	43,50%	56,50%	<i>Aleatoria</i>	DEH
16	Madre	(-)	(-)	265	270	19,80%	80,20%	<i>Moderadamente preferencial</i>	Normal
31	Probando	EDA:c.516delC	Patogénica	271	277	40%	60	<i>Aleatoria</i>	DEH
31	Madre	(-)	(-)	277	277	NI	NI	-	Normal
33	Probando	EDA: deleción Ex1	Patogénica	277	294	80,40%	19,60%	<i>Moderadamente preferencial</i>	DEH
33	Madre	(-)	(-)	277	283	36,00%	64,00%	<i>Aleatoria</i>	Normal
36	Probando	EDA: c.612delG	Patogénica	286	292	76,80%	23,30%	<i>Aleatoria</i>	DEH
36	Madre	(-)	(-)	286	292	55,90%	44,10%	<i>Aleatoria</i>	Normal
74	Probando	PseudoIKBKG Ex3-7	Polimorfismo	244	268	15,30%	84,70%	<i>Aleatoria</i>	Negativo
74	Madre	(-)	(-)	268	330	37,20%	62,70%	<i>Aleatoria</i>	Normal
77	Probando	EDA:c.1045G>A	Patogénica	270	272	44,50%	54,60%	<i>Aleatoria</i>	DEH
77	Madre	EDA:c.1045G>A	Patogénica	272	278	39,30%	60,70%	<i>Aleatoria</i>	DEH
78	Probando	IKBKG del Ex3-7	Patogénica	273	288	100,00%	0,00%	<i>Preferencial</i>	IP
78	Madre	(-)	(-)	273	282	62,40%	37,60%	<i>Aleatoria</i>	Normal

Estudios de inactivación del cromosoma X: A1pb/A2pb, diferentes alelos según el número de repeticiones (CAG) en el receptor de andrógenos (AR); A1%/A2%, porcentaje de inactivación de cada una de ellos; (*), Alelo portador de la variante c.871G>C; DEH, Displasia Ectodérmica Hipohidrótica; NI, resultado no informativo; aleatoria, porcentaje inactivación X \geq 80; moderadamente preferencial, inactivación X con valores entre 80 y 90; preferencial, porcentaje de inactivación X \geq 90.

5.4.3 Entidades clínico-moleculares y vías de señalización

Tras la integración del diagnóstico molecular con la valoración clínica, se han identificado hasta 16 entidades clínico-moleculares que permitió establecer una correlación con la categorización de enfermedades genéticas OMIM y Orphanet (Tabla 13) y su localización en la vía de señalización a la que afectaba, descritas al inicio en la Figura 4.

5.4.3.1 Genes de la vía EDA/NF- κ B

Se han localizado alteraciones a distintos niveles que originan los siguientes 5 tipos de displasias:

-DEHLX, MIM 305100, EDA. *Síndrome de Christ-Siemens-Touraine*. Como se ha mencionado anteriormente, la DEHLX es el tipo de DEH más frecuente (38 casos) y la más representada en la población española, en la mayoría de estos pacientes el fenotipo es más clásico, más fácilmente identificable y más completo, en cuanto a que presentan un mayor número de órganos y sistemas afectados (Figura 29). No obstante, la mayoría de las variantes identificadas en estos genes son privadas (35 variantes) y entre esta alta heterogeneidad alélica, aparecen variantes con diferentes grados de alteración en la vía NF- κ B y repercusión sobre el paciente que se discutirá más adelante.

Tabla 13. Descripción de las diferentes entidades clínico moleculares de DE detectadas en los pacientes de esta serie.

Diagnóstico Clínico-Molecular	GEN	OMIM	ORPHA	Vía señalización / estructura	Nº Casos
DEHLX	EDA	305100	181	Vía EDA/NF-kB	38
STHAGX1	EDA	313500	99798	Vía EDA/NF-kB	1
ECTD10A	EDAR	129490	1810	Vía EDA/NF-kB	3
ECTD10B	EDAR	224900	248	Vía EDA/NF-kB	1
ECTD10A	EDAR+LRP6	129490	238468	Vía EDA/NF-kB	1
IP	IKBKG	308300	464	Vía EDA/NF-kB	1
OODD	WNT10A	257980	2721	Vía Wnt/ β -catenina	5
SSPS	WNT10A	224750	50944	Vía Wnt/ β -catenina	2
STHAG4	WNT10A	150400	99798	Vía Wnt/ β -catenina	4
STHAG4	WNT10A+AXIN2	150400	99798	Vía Wnt/ β -catenina	1
STHAG7	LRP6+WNT10A	616724	99798	Vía Wnt/ β -catenina	1
ECTD3	MSX1	189500	99798	Vía Wnt/ β -catenina	2
ODCRCS	AXIN2	608615	300576	Vía Wnt/ β -catenina	1
OFC8	TP63	618149	199306	Vía TP63	1
ECTD2	GJB6	129500	189	Vía TP63	1
TDO	DXL3	190320	3352	Vía TP63	1
LADD	FGFR2	149730	2363	Vía FGF	1
DCWHKTA	DSP	615821	476096	Desmosomas	1
Total					66

DEHLX, displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al X; STHAGX1, agenesia dental selectiva tipo 1; ECTD10A, displasia ectodérmica tipo 10A; ECTD1B, displasia ectodérmica tipo 10B; IP, Incontinencia Pigmenti; OODD, displasia oculodentodigital; SSPS, síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge; STHAG4, agenesia dental selectiva tipo 4; STHAG7, agenesia dental selectiva tipo 7; ECTD3, Displasia Ectodérmica tipo 3; OFC8, Síndrome de hendidura orofacial 8; ODCRCS, síndrome de oligodoncia y cáncer colorectal; ECTD2, displasia ectodérmica tipo 2; TDO, displasia trico-dentosea; LADD, síndrome lacrimo auriculo dento digital; DCWHKTA, síndrome de eritroqueratodermia-miocardiopatía.

-ECTD10A (DEHAD), MIM 129490, *EDAR*. En cuanto a las 3 variantes observadas en este gen, todas ellas estaban localizadas en el dominio DD, muy conservado evolutivamente y necesario para la interacción con el gen *EDARADD*, por lo que tienen un efecto dominante (145) (ID 12, 18 y 42).

- ECTD10B (DEHAR), MIM 224900, *EDAR*. Una de las variantes observadas afecta al dominio funcional de unión a ligando (LBD) del gen y se heredan con un patrón recesivo, en este caso, la otra variante afecta al ajuste del mensajero, por lo tanto a la estructura de la proteína y origina este fenotipo (ID 5). A su vez, los fenotipos asociados a las variantes patogénicas en el gen *EDAR* son similares a los fenotipos de *EDA*, aunque en esta serie los primeros no presentaban manifestaciones oculares (sequedad ocular, ausencia de lágrimas, fotofobia, úlceras corneales ni quistes palpebrales) (Figura 30).

-STHAGX1, MIM 313500, *EDA*. Caso índice de una familia con oligodoncia como único signo clínico de DE (ID 51).

-IP (*Incontinencia Pigmentaria*), MIM 308300, *IKBKG*. En este estudio se analizaron molecularmente dos pacientes con sospecha clínica de IP, en ambas se observó aparentemente la misma variante clásica intragénica de los exones 3-10 en el gen *IKBKG* mediante MLPA P073-*IKBKG*. En una de ella, la delección era *de novo* y para la que el estudio de inactivación del cromosoma X mostró un silenciamiento preferencial (100%) del cromosoma X alterado (de origen materno) (Tabla 12). En el momento del diagnóstico (adolescente), clínicamente tenía escasa afectación: pelo ralo, escaso vello corporal, hipodontia y dientes cónicos (Figura 37) (ID 78).

En la segunda paciente, la delección también fue identificada en el padre, lo que indicaba que la delección debía estar en el pseudogen *IKBKG* (*IKBKGP1*), esto es un polimorfismo presente en un 2% de la población (137). También se ha demostrado que reordenamientos en el *IKBKGP1* pueden incrementar las microdeleciones en *IKBKG* (146), por lo que fue necesario confirmar que la microdelección detectada correspondía al pseudogen (147); además, en esta paciente los estudios posteriores de secuenciación tampoco revelaron otras alteraciones moleculares en la secuencia (ID 74).

5.4.3.2 Genes de la vía *Wnt*/ β -catenina

Afectando a esta vía se identifican 6 tipos de displasias, cuyas mayores manifestaciones son dentales, excepto para *WNT10A*.

-SSPS (*síndrome de Schöpf-Schulz-Passarge*), MIM 224750, *WNT10*. Se han identificado en dos pacientes con variantes que producen un truncamiento grave de la proteína. Una mujer de 69 años con variante en *WNT10A*: c.(18_43del26)(p.Arg7AlafsTer28) en homocigosis y que presentaba toda la clínica características del síndrome: múltiples hidrocistomas apocrinos en los párpados, queratodermia palmoplantar, hipotricosis, hipodoncia y distrofia de las uñas (ID 43), esta paciente desarrolló posteriormente siringofibroadenoma ecrino en la palma de la mano. El segundo caso fue de un niño (3 años) con la variante *WNT10A*:c.321C>A/p.Cys107Ter en homocigosis. Aunque se ha descrito que la queratodermia y los quistes en los párpados suelen aparecer con la edad (148), este paciente no presentaba queratodermia, pero ya eran observables los quistes palpebrales (ID 49), es importante resaltar este signo dada su correlación con el desarrollo de tumores anexiales de la piel (149, 150).

-OODD (*displasia odonto-ónico-dérmica*), MIM 257980, *WNT10A*. Este grupo es el más representado para el gen *WNT10A*, y en él están claramente reproducidos en 2/5 de los pacientes incluidos en este grupo, además ambos individuos presentan hiperqueratosis e hiperhidrosis en las palmas y plantas, hipodoncia, dientes cónicos, oncodisplasia y pelo seco y escaso; ambos casos causados por variantes dobles heterocigóticas en el gen *WNT10A* (ID 46,52). Existen dudas razonables en ubicar en este grupo a un tercer paciente con una sola variante en *WNT10A*:c.514A>T (p.Arg172Trp), ya que podría clasificarse como STHAG4, pero presenta características de DEH: hipohidrosis, escaso cuero cabelludo, vello corporal, piel seca, eritrodermia, hipodontia y uñas displásicas, esta variante la ha heredado del padre cuyas únicas manifestaciones clínicas fue la oligodontia (ID 41). Otros dos pacientes con variantes graves en doble heterocigosis se incluyeron en este grupo porque clínicamente y genéticamente sería lo correspondiente (ID 27, 4,6 años e ID 46, 12 años).

-ODCRCS (*síndrome de agenesia dental-cáncer colorrectal*), MIM 608615, *AXIN2*. Se identifica en un niño de padres jóvenes sin antecedentes de cáncer familiar hasta

la fecha (ID 72). Se informa el riesgo asociado a esta condición debido a la importancia en la prevención.

-ECTD3 (*síndrome de Witkop*), MIM 189500, *MSX1*. Se identifica en dos pacientes con displasia ectodérmica autosómica dominante con afectación fundamental de dientes y uñas (ID 59, 80).

-STHAG4, MIM 150400, *WNT10A*. En tres pacientes con oligodoncia causada por variantes en heterocigosis (ID 28, 39 y 87) o en homocigosis (ID 54, 88) (este último con otra variante en *AXIN2*).

-STHAG7, MIM 616724, *LRP6*. Paciente con oligodoncia y rasgos de displasia ectodérmica, presentaba variantes en *WNT10A* y *LRP6* (ID, 66), clínicamente mostraba ausencia de vello corporal, pelo ralo y escaso, oligodontia y dientes cónicos; en este caso es difícil establecer si el fenotipo está justificado por la variante en *WNT10A* o es la consecuencia de alteraciones en la expresión de ambos genes que contribuyen a la afectación de otros órganos o sistemas adicionales a los orodentales.

-ECTD10A, MIM 129490, *EDAR*+ *STHAG7*, MIM 616724, *LRP6*. Una paciente con variante en este gen que presentaba oligodontia y taurodontismo; además, era portadora de una variante en *EDAR* en el dominio LBD, con un efecto supuestamente recesivo, pero con manifestaciones de DEH, hipohidrosis, cejas y pestañas escasa y piel seca con dermatitis. Este caso nos volvemos a plantear si esta paciente manifiesta una clínica mixta por la interacción de la expresión de ambos genes (ID 55)

5.4.3.3 Genes de la vía de señalización TP63

-TDO (*displasia trico-dento-osea*), MIM 190320, *DLX3*. En un niño con retraso en la erupción dentaria, pelo ralo, rizado; referido sin más datos clínicos para descartar DE. Rasgos físicos parecidos al padre, pero no se envía para confirmar la variante en el progenitor (ID 56).

-OFC8, MIM 618149, *TP63*. Variante en heterocigosis que origina un codón finalizador muy prematuro que trunca la proteína de la isoforma $\Delta Np63$

(NM_001114980.1), cuya expresión se requiere en los queratinocitos y con efecto dominante. Surge *de novo* en una niña con cabello ralo y escaso, sin vello corporal, fisura palatina, oligodoncia, microdoncia y uñas frágiles (Figura 40) (ID 69).

-ECTD2 (*síndrome de Clouston*), MIM 129500, *GJB6*. Niña portadora de dos variantes en el gen *GJB6*, una delección de los exones 2-4 del gen en el alelo materno y una variante *missense* en la secuencia del alelo paterno; clínicamente manifestaba alteraciones del sudor, vello ausente, piel seca, dermatitis, eczemas, uñas pequeñas y frágiles, sequedad ocular, fotofobia e infecciones recurrentes, no presentaba sordera. Ambos padres portadores en heterocigosis sin clínica remarcable (Figura 36) (ID 67).

5.4.3.4 Otros genes implicados en la etiología de las DE

Se han identificado otros genes que pueden estar implicados en la etiología de las DE y que alteran otros mecanismos patogénicos que no son las vías clásicas.

-LADD (*síndrome lacrimo auriculo dento digital o de Levy-Hollister*), OMIM 149730, *FGFR2*. Variantes en el receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos pueden alterar la vía del FGF y afectar al desarrollo del pelo (28) y otros derivados ectodérmicos. Se identificó la variante patogénica, *FGFR2:c.2165G>C* (p.Arg722Thr) en el dominio intracelular de este receptor, en un niño con obstrucción lacrimal, microdontia, orejas despegadas, cara eritematosa con el calor, y sindactilia en los dedos 2-3 de los pies; la madre era también portadora de la misma variante y afectada con rasgos clínicos menos destacables (Figura 33)(ID 73). Las manifestaciones clásicas de este síndrome, sobre todo auricular y digital, estaban muy atenuadas en este paciente.

-DCWHKTA (*Síndrome de eritroqueratodermia-miocardopatía*), MIM 615821, *DSP*. Los genes que codifican para la desmoplakina, proteína estructural de los desmosomas, no pertenece a ninguna de las vías mencionadas, pero también están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de la piel. Se identificó un caso en un niño y en cuyo padre, también afectado, se evidenció

queratodermia palmoplantar, cabello impeinable y afectación cardiaca con taquicardia paroxística supra ventricular (ID.63)

En la Tabla 14 se recogen los resultados finales del diagnóstico clínico-molecular de cada caso.

Tabla 14. Resultados del diagnóstico clínico-molecular de la serie de paciente incluidos en el estudio.

ID	Sexo	Edad	Gen	Nucleótido	Proteína	Variante	Diagnóstico molecular	Herencia / Origen		Otras Variantes	Resultado
1	V	0,8	EDA	c.[904del35];[=]	p. [?];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
2	V	8,0	EDA	c.[612_629del18];[=]	p.[Ile205_Gly210del];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
3	V	9,1	EDA	c.[995G>A];[=]	p.[Cys332Tyr];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
4	V	6,0	EDA	c.[1045G>A];[=]	p.[Ala349Thr];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
5	V	41,6	EDAR	c.[52-2A>G];[212G>A]	p.[?];[Cys71Tyr]	VP/VP	DEHAR	AR	Heredada		POSITIVO
6	V	5,9	EDA	c.[653G>T];[=]	p.[Gly218Val];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
7	V	13,3	EDA	c.[892G>T];[=]	p.[Asp298Tyr];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
8	V	9,6	EDA	c.[895G>A];[=]	p.[Gly299Ser];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	EDARADD:c.308C>T	POSITIVO
9	V	5,0	EDA	c.[895G>C];[=]	p.[Gly299Arg];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
10	F	27,8	EDA	c. [Del gen];[=]	p.[?];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i> / Hemicigoto	(-)	POSITIVO
11	F	22,4	EDA	c.[729_738del10];[=]	p.[Thr245Alafs];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
12	F	1,8	EDAR	c.[1259G>A];[=]	p.[Arg420Gln];[=]	VP	DEHAD	AD	Heredada	(-)	POSITIVO
13	V	2,4	EDA	c.[58C>T];[=]	p.[Arg20Ter];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
14	V	1,5	EDA	c.[760C>T];[=]	p.[Gln254Ter];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
15	F	14,0	EDA	c.[871G>C];[=]	p.[Gly291Arg];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
16	F	3,8	EDA	c.[880G>T];[=]	p.[Glu294Ter];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
17	V	33,5	EDA	c.[546_581del36];[=]	p.[Gly183_Pro194del];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
18	V	3,3	EDAR	c.[1072C>T];[=]	p.[Arg358Ter];[=]	VP	DEHAD	AD	Heredada	(-)	POSITIVO
19	V	53,7	EDA	c.[1037G>A];[=]	p.[Cys346Tyr];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO

20	V	1,9	EDA	c.[Del Exón 1];[=]	p.[?];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
21	V	3,7	EDA	c.[572_589del18];[=]	p.[Pro191_Pro196del];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	EDARADD:c.308C>T	POSITIVO
22	V	2,4	EDA	c.[793+1G>C];[=]	p. [?];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
23	V	3,8	EDA	c.[572_589del18];[=]	p.[Pro191_Pro196del];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
24	V	0,7	EDA	c.[1045G>A];[=]	p.[Ala349Thr];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
25	V	1,2	EDA	c.[1069C>T];[=]	p.[Arg357Trp];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
26	V	1,5	EDA	c.[164T>C];[=]	p.[Leu55Pro];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
27	F	4,6	WNT10A	c.[1A>T];[321 C>A]	p.[M1?];[Cys107Ter]	VP/VP	OODD	AR	Heredada	(-)	POSITIVO
28	V	9,7	WNT10A	c. [682T>A];[=]	p.[Phe228Ile];[=]	VPP	STHAG4	AD	Heredada	(-)	POSITIVO
29	V	0,7	EDA	c. [726del8];[=]	p.[?];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
30	V	9,1	EDA	c.[1027T>G];[=]	p.[Tyr343Asp];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
31	F	12,8	EDA	c.[516delC];[=]	p.[Asn172fs*];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
32	V	7,9	EDA	c.[1049G>A];[=]	p.[Gly350Asp];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
33	F	10,2	EDA	c.[Del Exón 1];[=]	p.[?];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
34	V	1,7	EDA	c.[463C>T];[=]	p.[Arg 155Cys];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
35	V	0,6	EDA	c.[457C>T];[=]	p.[Arg153Cys];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	(-)	POSITIVO
36	F	17,4	EDA	c.[612delG];[=]	p. [?];[=]	VP	DEHLX	LX	<i>De novo</i>	EDAR:c.1109T>C	POSITIVO
37	V	3,5	EDA	c.[547_582del36];[=]	p.[Gly183_Pro194del];[=]	VP	DEHLX	LX	Heredada	(-)	POSITIVO
38	F	3,2	AXIN2	c.[733C>T];[=]	p.[Pro245Ser];[=]	VOUS	ODCRCS	AD	Heredada	EDARADD:c.308C>T	NO CONCLUYENTE
39	V	8,7	WNT10A	c. [682T>A];[=]	p.[Phe228Ile];[=]	VPP	STHAG4	AD	Heredada	EDARADD:c.308C>T	POSITIVO
40	V	35,3	EDA	c.[742-14T>G];[=]	p. [?];[=]	VOUS	DEHLX	LX	(-)	AXIN2:c.1419_1421delCCA / LPR6:c.2203G>A/	NO CONCLUYENTE

84	V	6,4	DSP	c.3922C>T];[=]	p.Arg1308Trp];[=]	VOUS	DCWHKTA	AD	(-)	(-)	NO CONCLUYENTE
85	V	22,8	(-)	c.[=];[=]	p.[=];[=]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NEGATIVO
86	V	16,0	GJB2	c.[101T>C];[=]	p.[p.Met34Thr];[=]	VOUS	(-)	(-)	(-)	EDAR:c.1109T>C / FGFR3:c.932C>T	NO CONCLUYENTE
87	F	11,8	WNT10A	c. [682T>A];[=]	p.[Phe228Ile];[=]	VPP	STHAG4	AD	Heredada	TERT:c.3268G>A	POSITIVO
88	V	10,3	WNT10A	c. [682T>A];[682T>A]	p.[Phe228Ile];[Phe228Ile]	VPP/VPP	STHAG4	AR	Heredada	AXIN2: c.140A>T	POSITIVO

VI - DISCUSIÓN

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En la distribución por sexos se observó un claro predominio de los varones, 62 (70,5%) frente a mujeres, 26 (29,5%), este resultado está notoriamente influenciado por ser el gen *EDA*, el gen más representado y estar localizado en el cromosoma X. En cuanto a la edad media a la que se alcanza el diagnóstico genético fue de 5,0 años en niños y 26,5 años en adultos, con unos tiempos de respuesta desde que se realiza el diagnóstico clínico que oscilan entre 15 y 27 meses respectivamente; no obstante, este dato está recogido en un contexto de reclutamiento para el estudio de investigación y no es representativo de la realidad médica actual en la que el diseño del panel NGS-ED-v.1 ya se ha trasladado para su uso clínico-asistencial de rutina y que permite acortar los tiempos de respuesta de diagnóstico (≤ 60 días).

6.2 RENDIMIENTO DE LA TÉCNICA Y GENES IDENTIFICADOS

Se ha desarrollado el panel NGS-ED-v.1 dirigido al diagnóstico molecular de los 89 genes descritos como los más prevalentes en las DE. Se ha aplicado a una población con sospecha clínica de DEH en su forma clásica y con sus manifestaciones más leves como la ADNS. El abordaje mediante el método convencional de secuenciación gen a gen, es más laborioso y costoso económicamente. Además, debido a la gran heterogeneidad genética y a la complejidad de vías que interaccionan durante el desarrollo embrionario en general y del ectodermo en particular, hacen sospechar que puede haber otros genes implicados en este tipo de displasias con manifestaciones fundamentalmente ectodérmicas que se quedan sin identificar mediante un análisis directo. Por lo tanto, esta herramienta de diagnóstico ha dado respuesta a una doble necesidad dentro de la genética médica y las genodermatosis.

Se realizó el estudio genético mediante el panel de genes específicos de DE sobre un total de 88 pacientes con sospecha clínica inicial de DEH que cumplían los criterios de inclusión del estudio. El panel permitió detectar las variantes patogénicas en 66 casos, lo que supuso un rendimiento del 75% de genes conocidos. El análisis del rendimiento ha sido bueno al incrementarse tanto el número de casos con diagnósticos positivos en un 12,5%, así como en la identificación de otros genes candidatos con clínica solapante hasta 12 genes en total.

El abordaje del diagnóstico clínico multidisciplinar y molecular mediante el panel dirigido NSG DEv.1 nos permite detectar hasta 16 entidades clínico-moleculares diferentes, su utilidad ya se ha demostrado durante la exposición de los resultados, pero en este apartado se discutirán los aspectos más relevantes de los mismos.

6.3 HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LAS DE

6.3.1 Los clásicos de la vía EDA/NF- κ B

EDA es el gen con mayor prevalencia entre pacientes con DEH, se ha publicado que se han detectado entre un 65-75% de variantes patogénicas detectadas en dicho gen, entre ella, el 85-90% se deben a alteraciones en su secuencia y en 10-15% a duplicaciones/delecciones del gen; en su receptor *EDAR* de han detectado variantes patogénicas, tanto en su forma AD como AR, el 10-15% de los casos (con >99% de las alteraciones descritas en su secuencia) (151). En este trabajo, las variantes en *EDA* se observan en el 57,6% de los casos, 92% de ellos con alteraciones en su secuencia y 8% con duplicaciones/delecciones del gen y las variantes en *EDAR* representan el 7,5% de los casos (con 100% de las alteraciones en su secuencia) (Tablas 8 y 11).

EDA y *EDAR* originan las entidades más reconocibles de esta patología. Aunque esto no quiere decir que los pacientes con variantes en el gen *EDA* presentan homogeneidad en el fenotipo, pues como hemos comentado, este gen presenta un mayor espectro mutacional, ya que la mayoría de las variantes identificadas en este gen son privadas (35 variantes en 39 casos no relacionados). No obstante, no se ha podido establecer una correlación fenotipo-genotipo en

estos pacientes, excepto para un tipo de variantes y en pacientes masculinos. En este sentido, la deleciones *in-frameshift* que no alteran el marco de lectura y que están localizadas en las repeticiones Gly-X-Y del dominio TNF de la proteína, presentan una hélice de colágeno más corta, pero que no afecta a la multimerización y la funcionalidad de la misma, causando un fenotipo más leve (152). En consecuencia, estos pacientes presentan un fenotipo hipomórfico como ya se ha descrito en otras series de pacientes masculinos (121, 124) y en población española (37). Posiblemente, esto indique que la diferencia en la expresividad variable entre unos individuos y otros se podría atribuir a la localización crítica o el efecto que pueda tener la variante sobre la función de la proteína y su efectividad en la activación de la vía de señalización EDA-NF-kB.

En cuanto a las mujeres portadoras de variantes en EDA, estas también mostraron heterogeneidad fenotípica, si bien todas ellas están afectadas en diferentes grados por síntomas relacionados con DEHLX, hipotricosis, hipodoncia y dientes cónicos. El análisis de las variantes en 8 niñas (casos índices) con resultado positivo para EDA mostró que, en 6 casos las variantes identificadas eran predictoras de graves consecuencias funcionales, incluida la interrupción de la proteína por desplazamiento de marco de lectura, eliminación parcial o total del gen EDA, en otro caso una variante de novo que afecta a un aminoácido (c.871G> C/p.Gly291Arg) que se ha descrito como crucial para el correcto plegamiento de las proteínas (122), y otra paciente mostró la variante EDA: c.1045G>A asociada a un fenotipo más leve con afectación pelo-dientes, sin alteraciones del sudor (ID 77); esta misma variante fue observada en dos niños con clínica completa de DEH. Aunque la expresividad puede ser variable entre hombres y mujeres, cuando se comparan las variables clínicas entre los pacientes EDA positivo de ambos sexos, vemos que en el grupo de mujeres está representado todo el espectro clínico de la DEH y que no hay diferencia en la distribución por sexos (Figura 32).

Por otro lado, entre las mujeres portadoras de variantes en EDA, ninguna presentaba variantes asociadas a los fenotipos hipomórficos antes mencionados en varones.

El análisis de inactivación del cromosoma X sobre las 8 niñas, fue informativo en 7 de ella, pero el patrón de inactivación fue aleatorio en 6 casos y en un caso, la inactivación fue moderadamente preferencial (ID, 33). La hermana

de una paciente, también afectada y ambas portadoras de la variante *EDA*: c.729_738del7, mostró un patrón de inactivación preferencial del alelo materno alterado que compartía con su hermana (ID, 11). Estos resultados indican que otro mecanismo biológico diferente a la inactivación X debe ser responsable de la variabilidad en la expresión clínica en estas mujeres, aunque hay que tener en consideración que el estudio se realizó en células sanguíneas y se desconoce si las células de la piel, pueden presentar un patrón de metilación diferente.

En estas familias, con mujeres portadoras de *DEHLX* asociadas a variantes patogénicas en el gen *EDA*, es importante mencionar que desde un punto de vista clínico, su identificación les permite ser candidatas a terapias prenatales con Ectodisplasia A recombinante, pudiendo así cambiar en el futuro su historia natural. Este grupo está en contacto con la red de referencia europea para el estudio de las genodermatosis y enfermedades raras de la piel (ERN-SKIN) para proporcionarles a nuestros pacientes la oportunidad de participar en ensayos clínicos reglados.

La señalización vía *EDA*-NF- κ B también se puede ver alterada por variantes patogénicas en el receptor de *EDA*, en este sentido, de acuerdo a lo descrito en la literatura, los pacientes con variantes detectadas en *EDAR* presentan características ectodérmicas similares a los anteriores.

En este gen, la variante *EDAR*:c.1109T>C (p.Val370Ala) descrita como polimorfismo atenuante de portadores en variantes *EDA*, se ha encontrado en 5 pacientes. En estos pacientes la variante era concomitante con otras variantes en los genes *EDA*, *WNT10A*, *GJB6* y *TP63* y en un caso negativo. Estos pacientes presentaban la clínica correspondiente a su variante primaria, esta baja representación en cada grupo, no hace posible valorar su repercusión sobre el fenotipo de estos pacientes (Tabla 14).

Se ha publicado que la contribución de *EDARADD* a las DEH es de un 1-2% (151), pero en esta serie, la única variante identificada en 7 pacientes fue *EDARADD*:c.308C>T (p.Ser103Phe), esta variante es muy prevalente en la población europea, su frecuencia alélica en la población sana es del 2% según la base de datos dbSNP y está categorizada en diferentes bases de datos como probablemente benigna. Las publicaciones iniciales relacionaban esta variante con oligodontia (132), posteriormente algunos autores han sugerido que puede hacer una contribución significativa a ADNS pero mostrando una baja penetrancia

(121). En este trabajo, las características clínicas 4/7 pacientes se explicaron por la presencia de otras variantes primarias en EDA (dos casos), *EDAR* y *WNT10A*. Pero en los otros 3 casos, dos pacientes con el fenotipo DEH clásico y uno con ADNS, debido a su alta frecuencia poblacional, no se consideró su contribución en la morbilidad de las DE (Tabla 14).

6.3.2 Vía Wnt/ β -catenina, un gen y diferentes síndromes

El gen *WNT10A* se ha considerado el tercero en importancia en la aparición de una DE con una repercusión de 5%-6% de los casos (151). Aunque en nuestra población, así como en la italiana, es el segundo gen candidato responsable de las anomalías de los apéndices ectodérmicos (37), (142). El aspecto más interesante de este gen es su asociación con un amplio espectro de alteraciones ectodérmicas que van desde los síndromes más complejos, como OODD y SSPS hasta ADNS (66, 142, 149, 153-157). Los hallazgos en este trabajo también revelan que variantes homocigotas o heterocigotas compuestas están vinculadas a un fenotipo más grave de displasias, ya sea OODD o SSPS, como se describió anteriormente. En algunos casos, la patogenicidad de estas variantes puede estar en función de la ubicación de la variante en un dominio funcional importante de la proteína, pero curiosamente, se han identificado las mismas variantes genéticas en pacientes con OODD o SPSS, se desconoce los factores que determinan que se exprese uno u otro síndrome, pero la edad puede ser un factor determinante, hay que tener en cuenta el hecho de que las alteraciones ungueales desaparecen con la edad mientras que la queratodermia y los quistes palpebrales aparecen más tardíamente, Así que algunos autores han planteado la hipótesis de que ambos síndromes son expresiones diferentes de un mismo genotipo clínico que evoluciona con la edad y puede estar subestimada en la población joven (148, 149), dejando abierta la posibilidad de la influencia de otros factores genéticos, epigenéticos y ambientales sobre la vías de señalización implicadas y la homeostasis ectodérmica (158). Esto también subraya la importancia del equipo multidisciplinar para llegar al diagnóstico molecular específico.

Los portadores de *WNT10A* que presentan un fenotipo más leve con agenesia lateral de los incisivos maxilares son el subtipo más común de ADNS, este aspecto se discute a continuación (159).

6.3.3 Vía Wnt/ β -catenina, varios genes y una misma clínica

La ADNS se presume como la forma no sindrómica de la DEH. El desarrollo dental implica la expresión de más de 200 genes (160). Entre la oligodontia no sindrómica se han descrito como genes más prevalentes, *EDA*, *WNT10A*, *AXIN2*, *MSX1*, *LRP6* y *PAX9* (23, 132, 161-164). Se ha intentado establecer una correlación definitiva entre el fenotipo y el gen alterado, y aunque algunos autores lo han sugerido, no siempre se ha podido establecer este paralelismo (165) y la clasificación clínica actual no se ha fundamentado en el tipo de dientes ausentes sino en base al gen alterado, así se han clasificado como ADNS: *STHAGX1* (MIM 313500) en *EDA*, *STHAG1* (MIM 106600) en *MSX1*, *STHAG3* (MIM 150400) en *PAX9*, *STHAG4* (MIM 150400) en *WNT10A*, *STHAG7* (MIM 616724) en *LRP6* y *ODCRCS* (MIM 608615) en *AXIN2*.

En este estudio, el grupo de sospecha clínica inicial sobre el que se ha obtenido un menor rendimiento diagnóstico y que al mismo tiempo ha revelado una mayor heterogeneidad genética, ha sido la ADNS (50%). En cuanto a la contribución de cada uno de estos genes, una vez alcanzado este diagnóstico molecular asociado a ADNS en 7 casos, observamos que: *WNT10A* está presente en el 85,7% (6/7) de los casos (coincidiendo con una variante en *AXIN2* en un caso y con una variante en *LRP6* en otro) y en 14,3% (1/7) la variante primaria estaba en *EDA*. Si tenemos en cuenta a todos los pacientes con ADNS aunque el resultado genético molecular haya sido negativo (incluyendo 4 pacientes más con resultado negativo), las alteraciones en *WNT10A* están presentes en el 54,5% de los pacientes ADNS de este estudio (6/11). Estos resultados están en concordancia con los datos que publican otros autores que describen que las variantes patogénicas en *WNT10A* están presentes en la mayoría de los pacientes con oligodontia (56-62%) (23, 155) mientras que la inclusión de los genes *EDARADD*, *PAX9*, *MSX1*, *AXIN2*, apenas incrementa un 11% la tasa de diagnóstico (132).

En referencia a *WNT10A*, un dato interesante que se extrae de nuestros resultados es que, entre las 10 variantes diferentes identificadas en el estudio, la única variante con una correlación directa con la ADNS es *WNT10A:c.682T>A* (p.Phe228Ile), pues en este trabajo no se han observado otras alteraciones ectodérmicas (aparte de la oligodontia) en los portadores de esta variante ni en homocigosis ni en heterocigosis.

La oligodoncia se puede presentar como parte de un síndrome o de forma aislada, en este contexto clínico de las DE se ha sugerido que a nivel molecular, la diferencia entre la oligodoncia sindrómica y no sindrómica puede estar originada por la pérdida de función de una proteína o por una proteína estructuralmente anormal que excede un umbral. Variantes en *EDA*, por ejemplo, puede causar una oligodoncia aislada o una DEH que incluye oligodoncia, hipotricosis e hipohidrosis (166, 167). Se ha sugerido que la agenesia dental no sindrómica causada por variantes en *EDA* se debe a que portan variantes que aún mantienen una actividad residual de activación de la vía NF- κ B. Además, la alteración en la activación de esta vía origina una pérdida de expresión de la molécula de señalización BMP4 que a su vez reduce la expresión de *WNT10A* y *WNT10B*, sugiriendo que *EDA* puede regular la expresión de *WNT10A*, *WNT10B* y *BMP4* a través de la vía NF durante el desarrollo dental (168).

Se sabe que en modelos caninos una pequeña cantidad de Ectodisplasia A recombinante puede rescatar defectos del cabello, glándulas salivales y sudoríparas, mientras que se requiere mayor dosis para restablecer la cantidad de dientes (169). Curiosamente, el fenotipo de oligodoncia en la agenesia dental aislada asociada a *EDA* afecta predominantemente a los incisivos y caninos, pero con alta posibilidad de persistencia de los primeros molares (163). Se ha sugerido que una actividad residual *EDA/EDAR* puede prevenir la hipoplasia de la mayoría de los apéndices ectodérmicos, excepto el desarrollo de dientes, especialmente los incisivos y caninos, estos autores indican que la posición de los dientes ausentes depende de la señalización *EDA* y que el desarrollo de incisivos y caninos pueda requerir de una dosis más alta de señalización de *EDA*, mientras que el desarrollo de los primeros molares requeriría de la dosis más baja o incluso ser independiente de la señalización de *EDA*.

En cuanto a la variante *EDARADD:c.308C>T* (p.Ser103Phe), por los motivos que ya se han explicado antes y debido a su alta frecuencia alélica en la población sana (2%) no se ha considerado que preste una contribución evidente en la morbilidad de las DE ni de la ADNS. Del mismo modo que, otras variantes observadas en los genes *PAX9* o *MSX1* asociados a ADNS, pero que presentaban una frecuencia alélica muy alta y que han sido clasificadas como benignas o probablemente benignas, tampoco se han considerado causales.

En la bibliografía consultada no se ha podido establecer una evidente correlación entre el genotipo y todos los tipos de ADNS. La gravedad de la oligodoncia varía incluso entre gemelos idénticos, lo que sugiere que puedan existir otros factores que impliquen a genes adicionales (herencia poligénica) o a una contribución de genes modificadores y/o incluso factores extrínsecos ambientales durante el embarazo (165).

6.3.4 Vía TP63, un gen y diferentes síndromes, cuando el locus manda

Hay DE que inicialmente se pensó que no estaban relacionadas, pero posteriormente se vio que eran el resultado de variantes alélicas diferentes en un mismo gen y que conducían a fenotipos clínicos marcadamente diferentes. Ya se ha mencionado que previamente al desarrollo de la genética molecular, las bases para clasificar los diferentes tipos de DE era el fenotipo y el modo de herencia. Actualmente, los datos moleculares ayudan a comprender la relación entre el defecto molecular subyacente, la alteración de la proteína y el fenotipo resultante. Un ejemplo clásico lo representan los síndromes asociados a *TP63* (70, 170); en este trabajo se han excluido intencionadamente los pacientes con rasgos sindrómicos reconocibles y no era esperable encontrar variantes en este gen, no obstante en este estudio se identificó un caso clínicamente más leve que los fenotipos habituales, una variante que era *de novo* en el transcrito $\Delta Np63\alpha$, que estaba originando una entidad clínica solapante con una DEH, recientemente, mediante el análisis de un panel de genes dirigido a detectar la etiología del paladar hendido no sindrómico, se identificaron variantes en siete genes, uno de ellos *TP63* (92); señalando la importancia de incluir el análisis de todos los genes de las vías implicadas para la detección de las formas no sindrómicas

Otro gen implicado en esta vía es el gen *DLX3* (proteína dominio homeobox distal-less). El gen *DLX3* tiene un papel esencial en la estratificación epidérmica y el desarrollo de apéndices ectodérmicos, placenta y huesos, induciendo la degradación productos específicos de *TP63* y modulando la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular y los marcadores de diferenciación de la piel (171). Es un gen altamente penetrante con patrón de herencia AD, implicado en el desarrollo de la TDO que se caracteriza por cabellos crespos o rizados desde el nacimiento, hipoplasia del esmalte con decoloración y taurodontismo en

molares, aumento de la densidad mineral ósea (DMO) general y aumento en el grosor de los huesos corticales del cráneo.

6.3.5 Genes de diferentes vías que interactúan

La complejidad de las DE se hace mayor en los casos en los que se ven afectados genes de diferentes vías, en estas situaciones la expresión del fenotipo se debe a la interacción de la disfunción de diferentes proteínas. Estas situaciones se ponen de manifiesto cada vez con mayor frecuencia desde la posibilidad de realizar los análisis genómicos. Así, se han observado en este trabajo fenotipos mixtos que ya se han comentado en los casos en los que se han detectado interacciones digénicas: *EDAR+LRP6* (ID:55), *WNT10A+LRP6* (ID:66) y *WNT10A+AXIN2* (ID:88). El uso generalizado de la NGS nos permitirá ir aclarando el impacto fenotípico de las combinaciones de varias alteraciones génicas.

6.3.6 Otros mecanismos que alteran la homeostasis de la piel

Otros mecanismos que alteran la homeostasis de la piel se deben a genes que codifican para los receptores de los factores de crecimiento de fibroblastos 2, 3 y 10 (*FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR10* respectivamente) son ligandos de la vía de señalización FGF o vía de los receptores de las tirosinas quinasas (RTK). La unión de los FGF a sus receptores FGFR fosforila a la quinasa inactiva y activa esta vía que comienzan en la superficie de la membrana celular. Los ligandos que se unen a los RTK incluyen los factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento derivados de plaquetas, y factor de células madres. Aunque la familia de factores FGF tienen un amplio rango de funciones, entre ellas nos interesa que principalmente estimulan la proliferación y diferenciación celular. Para desempeñar funciones tan diversas, los FGF pueden tener formas de *splicing* alternativas, o incluso tener diferentes codones de iniciación, consiguiendo de esta forma crear cientos de diferentes isoformas de FGF (al igual que sucede con *TP63*). En este trabajo se ha detectado alteraciones en genes representantes de esta vía que originan un tipo de DE, el síndrome

LADD que se ha descrito como una condición autosómica dominante con variabilidad genética y clínica (172, 173).

Además, se han detectado variantes en el gen de la desmoplaquina (*DSP*), esta es la proteína constituyente mayor de los desmosomas, estructuras moleculares complejas que mantienen las uniones celulares. La *DSP* se expresa muy activamente en el epitelio donde los desmosomas son los responsables de su integridad mecánica. Las variantes patogénicas en este gen se han asociado a alteraciones cardíacas, y a anomalías de la piel y el pelo. Fenotipos cutáneos sin manifestación cardíaca pueden estar originados por alteraciones en la *DSP* (174, 175).

En la Figura 45 se resaltan los diferentes tipos de DE detectadas en este trabajo y su localización respecto a las diferentes vías moleculares implicadas.

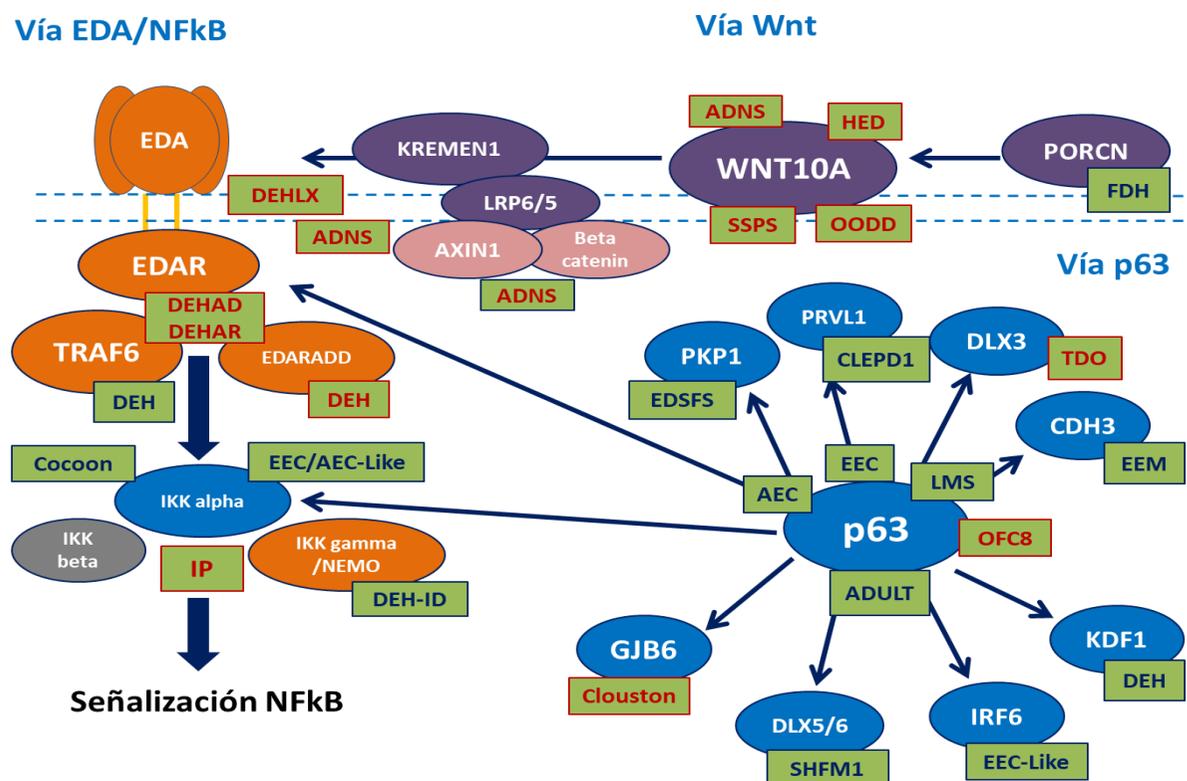


Figura 45. Interrelación entre los genes de las vías moleculares implicadas y las diferentes DE detectadas. Los genes de la vía EDA/NF-κB están representados por óvalos de color naranja, los genes de la vía Wnt están representados por óvalos de color púrpura y los de p63 por óvalos azules. Las abreviaturas en los rectángulos de color verde con letras azules indican diferentes y las letras en rojo resaltan las DE detectadas en este trabajo (adaptación de Wright et al., 2018)(2).

6.4 INTERPRETACIÓN DE LOS CASOS NEGATIVOS

La distribución de los perfiles clínicos, tanto en los casos positivos como negativos son similares, lo que indica que los pacientes no diagnosticados muestran una clínica altamente sugestiva de DEH, entre los que se deben ocultar genes no identificados en este trabajo y que también afectan a derivados ectodérmicos como el sudor, pelo, piel y dientes (Figuras 43-44).

6.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y PROTOCOLO DE ESTUDIO PROPUESTO

Se ha expuesto que existen numerosos tipos de DE y muchas de ellas presentan signos clínicos comunes, como hipodoncia, intolerancia al calor y escasez leve de cabello, lo que complica el diagnóstico clínico diferencial. Otras anomalías del desarrollo, como la presencia de oncodisplasia (que son anomalías inherentes al desarrollo de las uñas) pueden facilitar el diagnóstico diferencial entre los distintos tipos de DE.

Se han publicado los tipos de DE que pueden solaparse clínicamente con la DEH (excluyendo aquellas que se deben a los genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADDD* y *WNT10A*) y que deben tenerse en consideración en el momento del diagnóstico, estas son (151):

- ECTD3 (MIM 189500) (dos casos en esta serie)
- Displasia TDO (MIM 190320) (un caso en esta serie)
- IP (MIM 308300) (un caso en esta serie)
- Displasia ectodérmica, anhidrótica, con inmunodeficiencia de células T (MIM 612132) causada por variantes patogénicas en *NFKBIA* (variante de significado incierto no concluyente en esta serie).

Según nuestros resultados, además de los casos anteriores, bajo la misma sospecha clínica inicial hemos detectado también, los siguientes tipos de DE:

- ECTD2 (MIM 129500) (un caso en esta serie)
- OFC8 (MIM 618149) (un caso en esta serie)
- DCWHKTA (MIM 615821) (un caso en esta serie)
- Síndrome LADD (MIM 149730) (un caso en esta serie)

Y las entidades asociadas a ADNS fueron

- ODCRCS (MIM 608615) (un caso en esta serie)

- STHAGX1 (MIM 313500) (un caso en esta serie)
- STHAG4 (MIM 150400)(un caso en esta serie)
- STHAG7 (MIM 616724)un caso en esta serie)

Por otro lado, para establecer el alcance de la enfermedad y las necesidades de un individuo diagnosticado con DEH, se recomiendan las siguientes evaluaciones, que idealmente debería realizarse en una consulta multidisciplinar integrada por especialistas en genética clínica-genómica, pediatría, dermatología y enfermería especializada:

1. Elaboración del árbol familiar (3 generaciones), historia familiar, antecedentes personales y exploración clínica.
2. Evaluación inicial de la dentición en desarrollo, mediante palpación del alveolo dental del bebé/niño pequeño para establecer si hay brotes de dientes en desarrollo (que se manifiestan como protuberancias en el alveolo). Se recomienda una evaluación dental a la edad de un año.
3. Radiografías dentales, esenciales para determinar el grado de hipodoncia, tomadas con cierta frecuencia (anual) en el niño usando técnicas radiográficas dentales panorámicas o convencionales.
4. Estudio molecular mediante un panel multigénico que incluya *EDA*, *EDAR*, *EDARADD*, *WNT10A* y otros genes de interés (entidades para el diagnóstico diferencial). Teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: (1) Los genes incluidos en el panel y la sensibilidad diagnóstica de las pruebas utilizadas para cada gen varían según el laboratorio y es probable que cambien con el tiempo. (2) Algunos paneles multigénicos pueden incluir genes no asociados con la condición que nos interesa en este momento; por lo tanto, se debe determinar qué tipo de panel es más apropiado para identificar la causa genética de la afección al costo más razonable, limitando al máximo la identificación de variantes VOUS y hallazgos incidentales de variantes patogénicas en genes que no explican el fenotipo subyacente. (3) En algunos laboratorios, las opciones de panel pueden incluir un panel personalizado diseñado por el laboratorio y/o un análisis de exoma personalizado centrado en el fenotipo que incluye genes especificados por el médico. (4) Los métodos utilizados en un panel pueden incluir análisis de secuencia, análisis de delección/duplicación y/u otras pruebas no basadas en secuenciación. (5) El

consentimiento informado para hacer la prueba genética y la toma de fotos, es obligatorio.

Una vez obtenido el diagnóstico molecular, es necesario volver a valorar clínicamente al paciente, esta es una necesidad que ha surgido con los análisis de NGS, se trata de contrastar nuevamente los datos y establecer una correcta asociación entre el gen y las diferentes entidades clínico-moleculares relacionadas (176).

Así que, con toda la información bibliográfica recogida y los resultados que se desprenden de este trabajo, se propone el siguiente protocolo de estudio para la aproximación diagnóstica de la DEH (Figura 46).

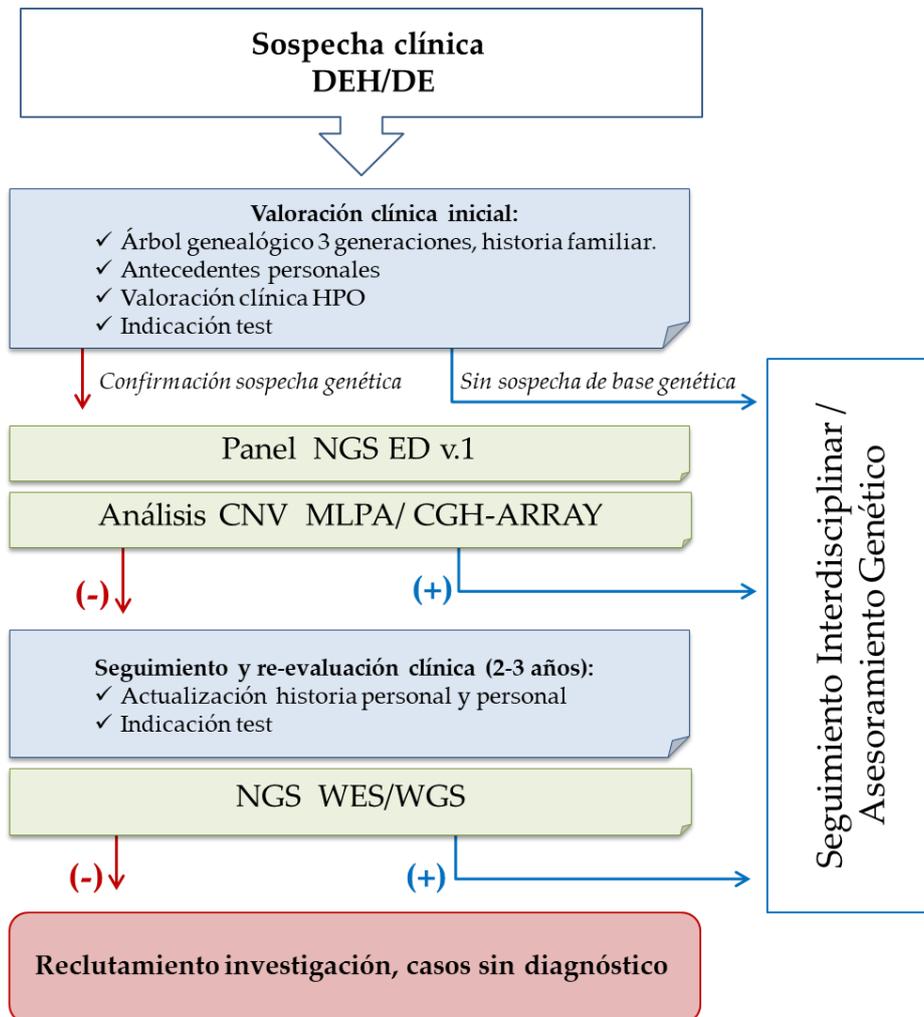


Figura 46. Protocolo de estudio propuesto para la DEH.

6.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las principales limitaciones a considerar en este estudio es el bajo número de pacientes analizados. Aunque podemos considerar un reto importante la totalidad de 88 pacientes reclutados con sospecha clínica de una enfermedad rara como es la DEH con una incidencia de 1-9/100.000 recién nacidos vivos; la dificultad la encontramos en el bajo número de individuos para alcanzar la significación estadística al intentar establecer un análisis de comparaciones por grupos. Esta circunstancia viene además determinada por la propia idiosincrasia de la enfermedad, al presentar una alta heterogeneidad genética y alélica, como así lo ha demostrado la baja recurrencia de las variantes genéticas observadas.

En segundo lugar, las limitaciones del estudio también se asocian a la imposibilidad de detectar casi un 19,3% de los casos en los que se sospecha que pueden haber alteraciones en otros genes no incluidos en el panel o a variantes epigenéticas en los promotores de los diferentes genes candidatos, para los que se requeriría otra tecnología en el análisis. En cuanto a la primera parte de esta limitación, que no es técnica, sino que es referente al número de genes incluidos en el estudio, hay que indicar que se han incorporado aquellos genes de mayor prevalencia en la DE en el momento del diseño, pero se trata de una herramienta dinámica que permite la incorporación al panel de los nuevos genes que se van descubriendo en relación a la etiología de las DE. Ahora bien, si lo que pretendemos es mejorar el rendimiento en cuanto a la capacidad de alcanzar el diagnóstico molecular, nos tendríamos que plantear el estudio mediante WES o incluso WGS.

Se valoraron los pro y contras de la decisión NGS-ED-v.1 versus WES, asumiendo esta limitación en favor de las siguientes ventajas. El panel NGS-ED-v1 dirigido contiene menos genes que WES/WGS, por lo tanto, puede incluir genes causantes de otras enfermedades; sin embargo, el panel presenta ventajas en un entorno clínico. Primeramente, el panel proporciona una mayor cobertura de secuenciación en las regiones dianas seleccionadas que WES/WGS. En segundo lugar, debido al menor número de variantes llamadas por carrera de secuenciación (~150-200), la interpretación de los resultados es relativamente más sencilla. Finalmente, el costo, la cantidad de tiempo para el análisis y la interpretación de los resultados y los requisitos de almacenamiento de datos son

menores con paneles específicos de NGS que con los enfoques WES/WGS, lo que lo convierte en una alternativa más práctica para la implementación clínica.

6.7 FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo se ha desarrollado en el contexto de un proyecto de investigación, con la doble finalidad de avanzar en el conocimiento de la base molecular de las DE en nuestra población por un lado y la identificación de nuevos genes por otro. Una vez que, en esta primera fase, se han caracterizado molecularmente la mayoría de las DE en nuestra población, el objetivo principal trata de identificar nuevos genes y/o vías de señalización molecular implicados en la aparición de las DE.

Por lo tanto los pacientes que han quedado sin diagnóstico molecular tras este estudio ,17 casos, se han incluido en una segunda fase de investigación en la que se utilizan otras herramientas de diagnóstico complementarias, mediante el array de CGH de SNPs-180K (comparative genomic hybridization and single nucleotide polymorphism array), que permite detectar cambios en el número de copias no repetitivas y regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH) con una resolución media de entre 5-20 Kb y, de este modo, se identifican nuevos locus que originan otras formas más raras de DE con patrón de herencia AR.

La aplicación de esta segunda fase ya ha dado sus frutos en uno de los pacientes con resultado negativo en este estudio. Un varón, con otro hermano afectado, con padres consanguíneos y con hipohidrosis como principal signo clínico, en el que se localizó una región con pérdida de heterocigosidad (LOH) en 13q23.1. Se analizaron los posibles genes candidatos en dicha región, donde se localizó el gen *CLDN10*, asociado al síndrome HELIX (MIM 617579). Este es un trastorno recientemente descrito con un patrón de herencia autosómico recesivo caracterizado por: hipohidrosis, desequilibrio electrolítico, disfunción de las glándulas lagrimales, ictiosis y xerostomía. Se han descrito variantes patogénicas causales en el gen *CLDN10* que codifica un tipo de proteínas claudinas. Las claudinas son componentes integrales de las proteínas de unión estrecha de membranas cuyas variantes patogénicas alteran el transporte de iones renales y la homeostasis de las glándulas ectodérmicas, entre otras disfunciones del epitelio.

Este hallazgo abre una puerta a la investigación del papel de las proteínas de unión de membrana, componentes de estructuras moleculares complejas, codificadas por genes como *DSP* o *CLDN10*, en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio y su vinculación a otro grupo específico de DE

En tercer lugar, los casos de DE que, tras estos estudios previos, no se hayan vinculado a ningún gen o locus, la aplicación de una herramienta tan potente como la secuenciación de genoma completo (WGS) permitirá la identificación de nuevos genes, transcritos y regiones reguladoras desconocidas hasta ese momento, que complementándola con ensayos funcionales en modelos animales podría aclarar su asociación patogénica con nuevos tipos de DE.

Por último, conocer su defecto molecular y el mecanismo patogénico es el primer paso para entender la enfermedad, permitiendo el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas dirigidas a un defecto molecular concreto pudiendo ofrecer un tratamiento individualizado.

Ya se ha mencionado la posibilidad de terapia sustitutiva con proteína *EDA* recombinante para el tratamiento precoz en la DEHLX (169). Esta proteína administrada en los primeros días de vida, a través del líquido amniótico, reestablece la función de la *EDA* alterada y estimula el desarrollo de dientes, glándulas sudoríparas y pelo (87). También se han impulsado otras líneas de investigación en el desarrollo de terapias que puedan prevenir o corregir el paladar hendido, estos estudios indican que los genes relacionados con *Eda* y *Edar* se expresan en tejidos palatales normales, la vía de señalización EDA/EDAR está aguas abajo de Pax9 en la palatogénesis; se ha demostrado que la administración intravenosa controlada de una nueva terapia de reemplazo de anticuerpos monoclonales de ratón, que actúan como un agonista de la vía de ectodisplasia A (*Eda*), puede resolver defectos del paladar hendido en embriones de ratón y que podrían aplicarse como terapias no invasivas, seguras y efectivas para el tratamiento del paladar hendido y otros trastornos monogénicos orofaciales (177).

VII – CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

1. La población analizada presenta en su distribución por sexos un claro predominio de los varones 70,5% frente a mujeres, 29,5%, debido a que el gen detectado con mayor frecuencia, EDA, está localizado en el cromosoma X.
2. La media de edad del diagnóstico clínico es de $9,8 \pm 12,5$ años, con rango de edades entre 6 meses y 69 años, siendo la población mayoritaria niños 78,4% (<18 años), con una media de edad entre los niños de $5,0 \pm 4,5$ y de $26,5 \pm 16,6$ en la población adulta.
3. El panel de secuenciación de NGS, ha supuesto un incremento del espectro de entidades relacionadas con la DEH en un 12,5% más de caso diagnosticados frente al abordaje clásico dirigido mediante MLPA y secuenciación Sanger.
4. El rendimiento del protocolo de diagnóstico aplicado en la población española con sospecha clínica de DEH ha sido del 75%, con un rendimiento máximo de 81,4% entre los pacientes con hipohidrosis y un mínimo del 50% entre formas no sindrómicas de DEH representada por la ADNS.
5. Se ha observado una alta heterogeneidad genética con la identificación de variantes en 24 genes, 12 de ellos con variantes primarias y directamente implicados en hasta 16 tipos de DE (o entidades clínico-moleculares) diferentes.
6. Se ha detectado una alta heterogeneidad alélica en las DE, identificándose 85 tipos de variantes diferentes, 63 categorizadas como primarias o causales. Entre estas, 14 no han sido publicadas hasta la fecha en bases de datos genómicas.

7. Un 89,4% de las variantes de los casos positivos han sido heredadas de uno de los progenitores y el 11,6% han sucedido *de novo*; los patrones de herencia predominantes han sido: 60,6%, ADLX, 24,2%, AD y 15,2%, AR.
8. Un 5,7% de los casos han resultado no concluyentes; su resolución requiere de un análisis de segregación de los progenitores y/o de otros familiares afectados de la enfermedad, para poder realizar una correcta interpretación y clasificación de las variantes anotadas.
9. Estos resultados han permitido establecer un algoritmo de diagnóstico clínico-molecular y efectivo para la DEH y para la detección de otros tipos de displasias ectodérmicas subyacentes con clínica solapante a esta entidad.
10. Se ha desarrollado el primer panel de genes NGS dirigido al diagnóstico de enfermedades genéticas con compromiso ectodérmico desde un hospital público de nuestra geografía. Este panel puede usarse de manera fiable para el diagnóstico molecular en genes relacionados con la DEH y puede servir como una herramienta primaria de screening antes de la aplicación de WES/WGS.

VIII – BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

1. Hayes A, Costa T, Scriver CR, Childs B. The effect of Mendelian disease on human health. II: Response to treatment. *Am J Med Genet.* 1985;21(2):243-55.
2. Pagnan NA, Visinoni AF. Update on ectodermal dysplasias clinical classification. *Am J Med Genet A.* 2014;164a(10):2415-23.
3. Freire-Maia N. Ectodermal dysplasias. *Hum Hered.* 1971;21(4):309-12.
4. Freire-Maia N. Nosologic groups. An overview. *Hum Hered.* 1977;27(4):251-6.
5. Priolo M, Silengo M, Lerone M, Ravazzolo R. Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep. *Clin Genet.* 2000;58(6):415-30.
6. Priolo M, Lagana C. Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification. *J Med Genet.* 2001;38(9):579-85.
7. Lamartine J. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28(4):351-5.
8. Itin PH, Fistarol SK. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;131c(1):45-51.
9. Visinoni AF, Lisboa-Costa T, Pagnan NA, Chautard-Freire-Maia EA. Ectodermal dysplasias: clinical and molecular review. *Am J Med Genet A.* 2009;149a(9):1980-2002.
10. Priolo M. Ectodermal dysplasias: an overview and update of clinical and molecular-functional mechanisms. *Am J Med Genet A.* 2009;149a(9):2003-13.
11. Schrier Vergano S, Santen G, Wieczorek D, Wollnik B, Matsumoto N, Deardorff MA. Coffin-Siris Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle. *GeneReviews* is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
12. Bramswig NC, Ludecke HJ, Alanay Y, Albrecht B, Barthelmie A, Boduroglu K, et al. Exome sequencing unravels unexpected differential diagnoses in individuals with the tentative diagnosis of Coffin-Siris and Nicolaidis-Baraitser syndromes. *Hum Genet.* 2015;134(6):553-68.
13. Carcavilla A, Garcia-Minaur S, Perez-Aytes A, Vendrell T, Pinto I, Guillen-Navarro E, et al. [Cardiofaciocutaneous syndrome, a Noonan syndrome related disorder: clinical and molecular findings in 11 patients]. *Med Clin (Barc).* 2015;144(2):67-72.

14. Ezquieta B, Santome JL, Carcavilla A, Guillen-Navarro E, Perez-Aytes A, Sanchez del Pozo J, et al. Alterations in RAS-MAPK genes in 200 Spanish patients with Noonan and other neuro-cardio-facio-cutaneous syndromes. Genotype and cardiopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(5):447-55.
15. Lopez-Gonzalez V, Domingo-Jimenez MR, Burglen L, Ballesta-Martinez MJ, Whalen S, Pinero-Fernandez JA, et al. [Schinzel-Giedion syndrome: a new mutation in SETBP1]. *An Pediatr (Barc)*. 2015;82(1):e12-6.
16. Micol-Martinez O, Lopez-Gonzalez V, Garcia-Marcos PW, Martinez-Menchon T, Guillen-Navarro E. [Congenital pachyonychia: A new case associated with the KRT17 gene]. *An Pediatr (Barc)*. 2016;84(3):174-6.
17. Freire-Maia N, Pinheiro M. Ectodermal dysplasias--some recollections and a classification. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1988;24(2):3-14.
18. Wright JT, Fete M, Schneider H, Zinser M, Koster MI, Clarke AJ, et al. Ectodermal dysplasias: Classification and organization by phenotype, genotype and molecular pathway. *Am J Med Genet A*. 2019;179(3):442-7.
19. Fete M, Hermann J, Behrens J, Huttner KM. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED): clinical and diagnostic insights from an international patient registry. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(10):2437-42.
20. Cambiaghi S, Restano L, Paakkonen K, Caputo R, Kere J. Clinical findings in mosaic carriers of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol*. 2000;136(2):217-24.
21. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat*. 2011;32(1):70-2.
22. Wright JT, Grange DK, M. F. Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. University of Washington, Seattle (WA): In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]; 1993-2019 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1112/>].
23. van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet*. 2012;49(5):327-31.
24. Yang Y, Luo L, Xu J, Zhu P, Xue W, Wang J, et al. Novel EDA p.Ile260Ser mutation linked to non-syndromic hypodontia. *J Dent Res*. 2013;92(6):500-6.
25. Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004;32(3):217-26.

26. De Coster PJ, Marks LA, Martens LC, Huysseune A. Dental agenesis: genetic and clinical perspectives. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(1):1-17.
27. Itin PH. Etiology and pathogenesis of ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet A.* 2014;164a(10):2472-7.
28. Koster MI. p63 in skin development and ectodermal dysplasias. *J Invest Dermatol.* 2010;130(10):2352-8.
29. Mathew SJ, Haubert D, Kronke M, Leptin M. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 12):1939-46.
30. Hubeau M, Ngadjewa F, Puel A, Israel L, Feinberg J, Chrabieh M, et al. New mechanism of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: impairment of ubiquitin binding despite normal folding of NEMO protein. *Blood.* 2011;118(4):926-35.
31. Lefebvre S, Fliniaux I, Schneider P, Mikkola ML. Identification of ectodysplasin target genes reveals the involvement of chemokines in hair development. *J Invest Dermatol.* 2012;132(4):1094-102.
32. Petrof G, Mellerio JE, McGrath JA. Desmosomal genodermatoses. *Br J Dermatol.* 2012;166(1):36-45.
33. Lefebvre S, Mikkola ML. Ectodysplasin research--where to next? *Semin Immunol.* 2014;26(3):220-8.
34. Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet.* 2014;30(1):24-31.
35. Cui CY, Yin M, Sima J, Childress V, Michel M, Piao Y, et al. Involvement of Wnt, Eda and Shh at defined stages of sweat gland development. *Development.* 2014;141(19):3752-60.
36. Moya-Quiles MR, Ballesta-Martinez MJ, Lopez-Gonzalez V, Glover G, Guillen-Navarro E. A compound heterozygous mutation in the EDAR gene in a Spanish family with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol Res.* 2010;302(4):307-10.
37. Martinez-Romero MC, Ballesta-Martinez MJ, Lopez-Gonzalez V, Sanchez-Soler MJ, Serrano-Anton AT, Barreda-Sanchez M, et al. EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):281.
38. Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, et al. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1555-62.
39. Fusco F, Pescatore A, Conte MI, Mirabelli P, Paciolla M, Esposito E, et al. EDA-ID and IP, two faces of the same coin: how the same IKBKG/NEMO

mutation affecting the NF-kappaB pathway can cause immunodeficiency and/or inflammation. *Int Rev Immunol.* 2015;34(6):445-59.

40. Aradhya S, Woffendin H, Jakins T, Bardaro T, Esposito T, Smahi A, et al. A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK-gamma) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum Mol Genet.* 2001;10(19):2171-9.

41. Wisniewski SA, Trzeciak WH. A rare heterozygous TRAF6 variant is associated with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Br J Dermatol.* 2012;166(6):1353-6.

42. Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC, Leo H, Jain N, Ma CA, et al. A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum Mutat.* 2008;29(6):861-8.

43. Wisniewski SA, 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(8):499-501.

44. Mikkola ML, Thesleff I. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):211-24.

45. Zhang Y, Tomann P, Andl T, Gallant NM, Huelsken J, Jerchow B, et al. Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways in hair follicle induction. *Dev Cell.* 2009;17(1):49-61.

46. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22429-33.

47. Alonso G, Garcia-Martin A, Munoz-Torres M. [Wnt pathway and sclerostin as new targets for assessment and treatment of osteoporosis]. *Med Clin (Barc).* 2012;139(14):634-9.

48. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127(3):469-80.

49. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-205.

50. Lei M, Guo H, Qiu W, Lai X, Yang T, Widelitz RB, et al. Modulating hair follicle size with Wnt10b/DKK1 during hair regeneration. *Exp Dermatol.* 2014;23(6):407-13.

51. Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med.* 2014;20(8):847-56.

52. Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science.* 2014;346(6205):1248012.

53. Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. 2005;27(3):247-61.
54. Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, Qureshi WM, Filip S, Mokry J. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):1647-70.
55. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 2001;105(4):533-45.
56. Narhi K, Jarvinen E, Birchmeier W, Taketo MM, Mikkola ML, Thesleff I. Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. *Development*. 2008;135(6):1019-28.
57. Zhang Y, Andl T, Yang SH, Teta M, Liu F, Seykora JT, et al. Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate. *Development*. 2008;135(12):2161-72.
58. Liu S, Zhang H, Duan E. Epidermal development in mammals: key regulators, signals from beneath, and stem cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):10869-95.
59. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007;445(7130):834-42.
60. Enshell-Seijffers D, Lindon C, Wu E, Taketo MM, Morgan BA. Beta-catenin activity in the dermal papilla of the hair follicle regulates pigment-type switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21564-9.
61. Lim X, Tan SH, Koh WL, Chau RM, Yan KS, Kuo CJ, et al. Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling. *Science*. 2013;342(6163):1226-30.
62. Lo Celso C, Prowse DM, Watt FM. Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development*. 2004;131(8):1787-99.
63. Choi YS, Zhang Y, Xu M, Yang Y, Ito M, Peng T, et al. Distinct functions for Wnt/beta-catenin in hair follicle stem cell proliferation and survival and interfollicular epidermal homeostasis. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):720-33.
64. Chen D, Jarrell A, Guo C, Lang R, Atit R. Dermal beta-catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development*. 2012;139(8):1522-33.
65. Yue H, Liang J, Yang K, Hua B, Bian Z. Functional analysis of a novel missense mutation in AXIN2 associated with non-syndromic tooth agenesis. *Eur J Oral Sci*. 2016;124(3):228-33.

66. Bohring A, Stamm T, Spaich C, Haase C, Spree K, Hehr U, 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(1):97-105.
67. Bornholdt D, Oeffner F, König A, Happel R, Alanay Y, Ascherman J, et al. PORCN mutations in focal dermal hypoplasia: coping with lethality. *Hum Mutat.* 2009;30(5):E618-28.
68. Fan X, Wang D, Burgmaier JE, Teng Y, Romano RA, Sinha S, et al. Single Cell and Open Chromatin Analysis Reveals Molecular Origin of Epidermal Cells of the Skin. *Dev Cell.* 2018;47(1):21-37.e5.
69. Schmale H, Bamberger C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene.* 1997;15(11):1363-7.
70. Soares E, Zhou H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(7):1179-90.
71. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998;2(3):305-16.
72. Rinne T, Clements SE, Lamme E, Duijf PH, Bolat E, Meijer R, et al. A novel translation re-initiation mechanism for the p63 gene revealed by amino-terminal truncating mutations in Rapp-Hodgkin/Hay-Wells-like syndromes. *Hum Mol Genet.* 2008;17(13):1968-77.
73. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2004;2(7):371-86.
74. Mangiulli M, Valletti A, Caratozzolo MF, Tullo A, Sbisa E, Pesole G, et al. Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(18):6092-104.
75. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999;398(6729):708-13.
76. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999;398(6729):714-8.
77. Pellegrini G, Rama P, Matuska S, Lambiase A, Bonini S, Pocobelli A, et al. Biological parameters determining the clinical outcome of autologous cultures of limbal stem cells. *Regen Med.* 2013;8(5):553-67.
78. Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S, et al. DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development.* 2012;139(4):772-82.

79. Sethi I, Romano RA, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, et al. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 2015;16:584.
80. Cavazza A, Miccio A, Romano O, Petiti L, Malagoli Tagliazucchi G, Peano C, et al. Dynamic Transcriptional and Epigenetic Regulation of Human Epidermal Keratinocyte Differentiation. *Stem Cell Reports*. 2016;6(4):618-32.
81. Deutsch GB, Zielonka EM, Coutandin D, Weber TA, Schafer B, Hannewald J, et al. DNA damage in oocytes induces a switch of the quality control factor TAp63alpha from dimer to tetramer. *Cell*. 2011;144(4):566-76.
82. Terrinoni A, Serra V, Bruno E, Strasser A, Valente E, Flores ER, et al. Role of p63 and the Notch pathway in cochlea development and sensorineural deafness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(18):7300-5.
83. Cefalu S, Lena AM, Vojtesek B, Musaro A, Rossi A, Melino G, et al. TAp63gamma is required for the late stages of myogenesis. *Cell Cycle*. 2015;14(6):894-901.
84. Rouleau M, Medawar A, Hamon L, Shivtiel S, Wolchinsky Z, Zhou H, et al. TAp63 is important for cardiac differentiation of embryonic stem cells and heart development. *Stem Cells*. 2011;29(11):1672-83.
85. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL, Khavari PA. Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. *Trends Genet*. 2013;29(1):31-40.
86. Huttner K. Future developments in XLHED treatment approaches. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(10):2433-6.
87. Schneider H, Faschingbauer F, Schuepbach-Mallepell S, Korber I, Wohlfart S, Dick A, et al. Prenatal Correction of X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *N Engl J Med*. 2018;378(17):1604-10.
88. Kishore M, Panat SR, Aggarwal A, Agarwal N, Upadhyay N, Ajai K, et al. Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia (ED): A Case Series. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(1):273-5.
89. Guazzarotti L, Tadini G, Mancini GE, Giglio S, Willoughby CE, Callea M, et al. Phenotypic heterogeneity and mutational spectrum in a cohort of 45 Italian males subjects with X-linked ectodermal dysplasia. *Clin Genet*. 2015;87(4):338-42.
90. Burger K, Schneider AT, Wohlfart S, Kiesewetter F, Huttner K, Johnson R, et al. Genotype-phenotype correlation in boys with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(10):2424-32.
91. Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S, Jost B, Dumas M, Le Gras S, et al. A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. *J Med Genet*. 53. BMA House, Tavistock Square, London, WC1H 9JR2016. p. 98-110.

92. Shibano M, Watanabe A, Takano N, Mishima H, Kinoshita A, Yoshiura KI, et al. Target Capture/Next-Generation Sequencing for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in the Japanese Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020;57(1):80-7.
93. Yu M, Wong SW, Han D, Cai T. Genetic analysis: Wnt and other pathways in nonsyndromic tooth agenesis. *Oral Dis.* 2019;25(3):646-51.
94. Lemke JR, Kernland-Lang K, Hortnagel K, Itin P. Monogenic human skin disorders. *Dermatology.* 2014;229(2):55-64.
95. Kohler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gourdine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1018-d27.
96. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
97. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:104-8.
98. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
99. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289-91.
100. Kuhn RM, Karolchik D, Zweig AS, Trumbower H, Thomas DJ, Thakkapallayil A, et al. The UCSC genome browser database: update 2007. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Database issue):D668-73.
101. Orphanet: El portal sobre enfermedades raras y medicamentos huérfanos. Copyright, INSERM 1997. [Available from: <https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/?lng=ES>.
102. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: National Library of Medicine (US). Genetic Home Reference [Internet] Bethesda (MD): The library; 2013 Sep 16 [updated November 2018; March 2019]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/hypohidrotic-ectodermal-dysplasia>.
103. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Bethesda (MD) [Available from: <https://www.omim.org/>.
104. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-91.
105. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.

106. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
107. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 11. United States 2014. p. 361-2.
108. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812-4.
109. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 7. United States 2010. p. 248-9.
110. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745-7.
111. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67.
112. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(5):1185-90.
113. Kopyanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978-80.
114. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 2011;32(5):557-63.
115. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577-81.
116. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564-9.
117. Jones JR. Nonrandom X chromosome inactivation detection. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014;80:Unit 9.7.
118. Quezada Urban R, Diaz Velasquez CE, Gitler R, Rojo Castillo MP, Sirota Toporek M, Figueroa Morales A, et al. Comprehensive Analysis of Germline Variants in Mexican Patients with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility. *Cancers (Basel)*. 2018;10(10).
119. Paakkonen K, Cambiaghi S, Novelli G, Ouzts LV, Penttinen M, Kere J, et al. The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Hum Mutat*. 2001;17(4):349.

120. 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(2):380-9.
121. Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. Candidate gene analysis of tooth agenesis identifies novel mutations in six genes and suggests significant role for WNT and EDA signaling and allele combinations. *PLoS One.* 2013;8(8):e73705.
122. Schneider P, Street SL, Gaide O, Hertig S, Tardivel A, Tschopp J, et al. Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *J Biol Chem.* 2001;276(22):18819-27.
123. Lexner MO, Bardow A, Juncker I, Jensen LG, Almer L, Kreiborg S, et al. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families. *Clin Genet.* 2008;74(3):252-9.
124. Bayes M, Hartung AJ, Ezer S, Pispá J, Thesleff I, Srivastava AK, 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(11):1661-9.
125. Shimomura Y, Wajid M, Weiser J, Kraemer L, Ishii Y, Lombillo V, et al. Identification of mutations in the EDA and EDAR genes in Pakistani families with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin Genet.* 75. Denmark2009. p. 582-4.
126. Li D, Xu R, Huang F, Wang B, Tao Y, Jiang Z, et al. A novel missense mutation in collagenous domain of EDA gene in a Chinese family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Genet.* 2015;94(1):115-9.
127. Ruiz-Heiland G, Jabir S, Wende W, Blecher S, Bock N, Ruf S. Novel missense mutation in the EDA gene in a family affected by oligodontia. *J Orofac Orthop.* 2016;77(1):31-8.
128. van der Hout AH, Oudesluijs GG, Venema A, Verheij JB, Mol BG, Rump P, et al. Mutation screening of the Ectodysplasin-A receptor gene EDAR in hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(6):673-9.
129. Salas-Alanis JC, Wozniak E, Mein CA, Duran Mckinster CC, Ocampo-Candiani J, Kelsell DP, et al. Mutations in EDA and EDAR Genes in a Large Mexican Hispanic Cohort with Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *Ann Dermatol.* 2015;27(4):474-7.
130. Vincent MC, Biancalana V, Ginisty D, Mandel JL, Calvas P. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(5):355-63.

131. Fujimoto A, Kimura R, Ohashi J, Omi K, Yuliwulandari R, Batubara L, et al. A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Hum Mol Genet.* 2008;17(6):835-43.
132. Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C, Norderyd J, Dahl N. Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes. *Am J Med Genet A.* 2011;155a(7):1616-22.
133. Putcha GV, Bejjani BA, Bleoo S, Booker JK, Carey JC, Carson N, et al. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genet Med.* 2007;9(7):413-26.
134. Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, Lanneluc I, Callouet E, Laoudj D, et al. Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet.* 2000;26(2):142-4.
135. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med.* 2002;346(4):243-9.
136. Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, et al. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature.* 2000;405(6785):466-72.
137. Bardaro T, Falco G, Sparago A, Mercadante V, Gean Molins E, Tarantino E, et al. Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti, and a PCR-based method to discriminate NEMO/IKKgamma gene deletion. *Hum Mutat.* 2003;21(1):8-11.
138. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D980-5.
139. Zhou HL, Yang S, Gao M, Zhao XY, Zhu YG, Li W, et al. A novel missense mutation L468Q of keratin 6a in pachyonychia congenita type 1. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21(3):351-5.
140. Roessler E, El-Jaick KB, Dubourg C, Velez JI, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, et al. The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the SHH gene in humans predicts loss-of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis. *Hum Mutat.* 2009;30(10):E921-35.
141. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med.* 2005;352(14):1413-24.
142. Guazzarotti L, Tadani G, Mancini GE, Sani I, Pisanelli S, Galderisi F, et al. WNT10A gene is the second molecular candidate in a cohort of young Italian

subjects with ectodermal derivative impairment (EDI). *Clin Genet*. 2018;93(3):693-8.

143. Yang J, Wang SK, Choi M, Reid BM, Hu Y, Lee YL, et al. Taurodontism, variations in tooth number, and misshapened crowns in Wnt10a null mice and human kindreds. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(1):40-58.

144. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 2016;18(7):696-704.

145. Masui Y, Farooq M, Sato N, Fujimoto A, Fujikawa H, Ito M, et al. A missense mutation in the death domain of EDAR abolishes the interaction with EDARADD and underlies hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Dermatology*. 2011;223(1):74-9.

146. Fusco F, Paciolla M, Pescatore A, Lioi MB, Ayuso C, Faravelli F, et al. Microdeletion/duplication at the Xq28 IP locus causes a de novo IKBKG/NEMO/IKKgamma exon4_10 deletion in families with Incontinentia Pigmenti. *Hum Mutat*. 2009;30(9):1284-91.

147. Barbato E, Traversa A, Guarnieri R, Giovannetti A, Genovesi ML, Magliozzi MR, et al. Whole exome sequencing in an Italian family with isolated maxillary canine agenesis and canine eruption anomalies. *Arch Oral Biol*. 2018;91:96-102.

148. Tziotzios C, Petrof G, Liu L, Verma A, Wedgeworth EK, Mellerio JE, et al. Clinical features and WNT10A mutations in seven unrelated cases of Schopf-Schulz-Passarge syndrome. *Br J Dermatol*. 2014;171(5):1211-4.

149. Castori M, Castiglia D, Brancati F, Foglio M, Heath S, Floriddia G, et al. Two families confirm Schopf-Schulz-Passarge syndrome as a discrete entity within the WNT10A phenotypic spectrum. *Clin Genet*. 2011;79(1):92-5.

150. Riera-Monroig J, Del Carmen Martinez-Romero M, Alos L, Guillen-Navarro E, Mascaro JM, Jr. Eccrine Syringofibroadenoma as a clue for the diagnosis of Schopf-Schulz-Passarge syndrome in acquired palmoplantar keratoderma. *J Cutan Pathol*. 2020.

151. Wright JT, Grange DK, M. F. Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-20202003 Apr 28 [Updated 2017 Jun 1] [Available from: from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1112/>].

152. Dietz J, Kaercher T, Schneider AT, Zimmermann T, Huttner K, Johnson R, et al. Early respiratory and ocular involvement in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Pediatr*. 2013;172(8):1023-31.

153. Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. *Hum Genet.* 2014;133(1):117-24.
154. Plaisancie J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, et al. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2013;161a(4):671-8.
155. Tardieu C, Jung S, Niederreither K, Prasad M, Hadj-Rabia S, Philip N, et al. Dental and extra-oral clinical features in 41 patients with WNT10A gene mutations: A multicentric genotype-phenotype study. *Clin Genet.* 2017;92(5):477-86.
156. Bergendal B, Norderyd J, Zhou X, Klar J, Dahl N. Abnormal primary and permanent dentitions with ectodermal symptoms predict WNT10A deficiency. *BMC Med Genet.* 2016;17(1):88.
157. Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Norderyd J, Dahl N. WNT10A mutations account for (1/4) of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *Am J Med Genet A.* 2014;164a(2):353-9.
158. Wang J, Sun K, Shen Y, Xu Y, Xie J, Huang R, et al. DNA methylation is critical for tooth agenesis: implications for sporadic non-syndromic anodontia and hypodontia. *Sci Rep.* 2016;6:19162.
159. Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Matuszewska-Trojan S, Jagodzinski PP. WNT10A coding variants and maxillary lateral incisor agenesis with associated dental anomalies. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(1):1-8.
160. Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(6):844-50.
161. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet.* 2000;24(1):18-9.
162. Song S, Han D, Qu H, Gong Y, Wu H, Zhang X, et al. EDA gene mutations underlie non-syndromic oligodontia. *J Dent Res.* 2009;88(2):126-31.
163. Han D, Gong Y, Wu H, Zhang X, Yan M, Wang X, et al. Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis. *Eur J Med Genet.* 2008;51(6):536-46.
164. Massink MP, Creton MA, Spanevello F, Fennis WM, Cune MS, Savelberg SM, et al. Loss-of-Function Mutations in the WNT Co-receptor LRP6 Cause Autosomal-Dominant Oligodontia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(4):621-6.
165. Bock NC, Lenz S, Ruiz-Heiland G, Ruf S. Nonsyndromic oligodontia : Does the Tooth Agenesis Code (TAC) enable prediction of the causative mutation? *J Orofac Orthop.* 2017;78(2):112-20.

166. Mues GI, Griggs R, Hartung AJ, Whelan G, Best LG, Srivastava AK, et al. From ectodermal dysplasia to selective tooth agenesis. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(9):2037-41.
167. Mues G, Tardivel A, Willen L, Kapadia H, Seaman R, Frazier-Bowers S, et al. Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(1):19-25.
168. Shen W, Wang Y, Liu Y, Liu H, Zhao H, Zhang G, et al. Functional Study of Ectodysplasin-A Mutations Causing Non-Syndromic Tooth Agenesis. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154884.
169. Casal ML, Lewis JR, Mauldin EA, Tardivel A, Ingold K, Favre M, et al. Significant correction of disease after postnatal administration of recombinant ectodysplasin A in canine X-linked ectodermal dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2007;81(5):1050-6.
170. Rostagno P, Wolchinsky Z, Vigano AM, Shivtiel S, Zhou H, Van Bokhoven H, et al. Embryonic stem cells as an ectodermal cellular model of human p63-related dysplasia syndromes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;395(1):131-5.
171. Di Costanzo A, Festa L, Roscigno G, Vivo M, Pollice A, Morasso M, et al. A dominant mutation etiologic for human tricho-dento-osseous syndrome impairs the ability of DLX3 to downregulate DeltaNp63alpha. *J Cell Physiol*. 2011;226(8):2189-97.
172. Hajianpour MJ, Bombei H, Lieberman SM, Revell R, Krishna R, Gregorsok R, et al. Dental issues in lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome: An autosomal dominant condition with clinical and genetic variability. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(3):157-63.
173. Rohmann E, Brunner HG, Kayserili H, Uyguner O, Nurnberg G, Lew ED, et al. Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome. *Nat Genet*. 2006;38(4):414-7.
174. Boyden LM, Kam CY, Hernandez-Martin A, Zhou J, Craiglow BG, Sidbury R, et al. Dominant de novo DSP mutations cause erythrokeratoderma-cardiomyopathy syndrome. *Hum Mol Genet*. 2016;25(2):348-57.
175. Boule S, Fressart V, Laux D, Mallet A, Simon F, de Groote P, et al. Expanding the phenotype associated with a desmoplakin dominant mutation: Carvajal/Naxos syndrome associated with leukonychia and oligodontia. *Int J Cardiol*. 2012;161(1):50-2.
176. Hennekam RC, Biesecker LG. Next-generation sequencing demands next-generation phenotyping. *Hum Mutat*. 2012;33(5):884-6.
177. Jia S, Zhou J, Wee Y, Mikkola ML, Schneider P, D'Souza RN. Anti-EDAR Agonist Antibody Therapy Resolves Palate Defects in Pax9(-/-) Mice. *J Dent Res*. 2017;96(11):1282-9.

ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL.

Publicaciones:

- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Sánchez-Soler MJ, Serrano-Antón AT, Barreda-Sánchez M, et al. EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population. *Orphanet J Rare Dis.* 2019; 14(1):281.
- Riera-Monroig J, **Martínez-Romero MC**, Alos L, Guillén-Navarro E, Mascaro JM, Jr. Eccrine Syringofibroadenoma as a clue for the diagnosis of Schopf-Schulz-Passarge syndrome in acquired palmoplantar keratoderma. *J Cutan Pathol.* 2020.

Ponencias en congresos:

- **Martínez, MC.** Ponencia: Identificación de Variantes genéticas en la Displasia Ectodérmica Hipohidrótica. VIII Congreso Nacional Enfermedades Raras. Libro de Abstrac ISBN: 978-84-16534-79-1. Murcia, 24-26 de Octubre de 2015.
- Guillén-Navarro E, **Martínez-Romero MC.** National program for molecular characterization of ED Spanish patients: importance of multidisciplinary clinic and genetic counselling. Ponencia. 7th International Conference on Ectodermal Dysplasia. European Human Genetic Conference 2018. Murcia, 12-14 de Abril de 2018.

Comunicaciones a congresos:

- Guillén-Navarro E, **Martínez-Romero M**, Barreda María; Ballesta-Martínez MJ, López-González V2, Sánchez-Soler MJ, Glover Guillermo. Identificación de variantes genéticas en pacientes con displasia ectodérmica hipohidrótica la población española. Poster. XXVIII Congresso Brasileiro de Genética Médica 2016. Belem, 15 a 18 de Junio de 2016.
- Serrano Antón AT, Sánchez Soler MJ, López González V, **Martínez-Romero MC**, Guillén-Navarro E. Displasia Ectodérmica Hipohidrótica en población pediátrica. Poster. IX Congreso Nacional Enfermedades Raras. Libro de Abstrac ISBN: 913 78-84-617-7043-4. Murcia, 17-20 de Noviembre de 2016.

- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Barreda-Sánchez M, Rodríguez-Peña L, Martínez-Menchón MT, Sánchez-Pedreño P, Glover-López G y Guillén-Navarro E. Resultados preliminares del proyecto para la caracterización fenotípica y genotípica de la Displasia Ectodérmica Hipohidrótica (DEH) en la población española. Poster. I Jornadas Científicas del IMIB-ARRIXACA. Murcia, 11 de Noviembre de 2016.
- **Martínez-Romero MC1**, Ballesta-Martínez, López-González V, Barreda-Sánchez M, Rodríguez-Peña LI, Martínez-Menchón MT, Sánchez-Pedreño P, Glover G1, Carbonell P, Guillén-Navarro E y grupo GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica). Mutational spectrum in 39 Spanish patients with Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. 47th Annual European Society for Dermatological Research 2017. Salzburgo 27-30 de Septiembre de 2017.
- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V1, Barreda-Sánchez M, Rodríguez-Peña L, García Chicano, M, Sánchez-Soler MJ, Martínez-Menchón MT, Sánchez-Pedreño P, Carbonell-Meseguer, P, Glover-López G, López-Expósito, I, Guillén-Navarro E y grupo GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica). Aplicación de la secuenciación masiva (NGS) al estudio genético de la Displasia Ectodérmica. X Congreso Internacional de Enfermedades Raras. UCAM, Guadalupe (Murcia), 24- 25 de Noviembre de 2017.
- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Barreda-Sánchez M, Rodríguez-Peña LI, Martínez-Menchón MT, Sánchez-Pedreño P, Glover G, Carbonell P, Gener B, La Fuente P, Guillén-Navarro E y grupo GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica). Identification of novel mutations in FGFR2 gene in two families with LADD syndrome by Next-Generation Sequencing (E-P04.08). European Human Genetic Conference 2018. Milan, 16 al 19 de Junio de 2018.
- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V; Barreda-Sánchez M, Sánchez-Soler MJ, Serrano-Antón AT, Martínez-Menchón MT, Rodríguez-Peña LI, Carbonell-Meseguer, Frías-Iniesta J, Sánchez-Pedreño P, Glover G, Guillén-Navarro E y grupo GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica). Poster. Variantes alélicas en la población española con alteraciones en el desarrollo de derivados ectodérmicos (genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* y *WNT10A*). III Jornadas Científicas del IMIB-ARRIXACA. Murcia, 19 y 20 de Noviembre de 2018.

- Borja Melero Nicolás, Vanesa López-González, Maria Juliana Ballesta-Martínez, **Martínez-Romero MC**; Encarnación Guillén-Navarro. Síndrome AEC (Anquinoblefaron-Displasia Ectodérmica-Fisura palatina-labial). La importancia de la sospecha clínica dirigida para un diagnóstico precoz. Poster. XI Congreso Internacional de Enfermedades Raras. Murcia, 16 y 17 de Noviembre 2018.
- **Martínez-Romero MC**, Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Barreda-Sánchez M, Rodríguez-Peña L, Martínez-Menchón MT, Sánchez-Pedreño P, Glover G, Carbonell P, Cabello-Chaves V, Guillén-Navarro E y grupo GIEDE (Grupo de Investigación Español de Displasia Ectodérmica). A novel pathogenic variant in CLDN10 gene associated with HELIX síndrome. European Human Genetic Conference 2020. Berlín, 6-9 de Junio de 2020.

Proyectos:

- **“Caracterización fenotípica y genotípica de la Displasia Ectodérmica Hipohidrótica en población española”**.Entidades financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Expediente; PI14/01259.
- **“Implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico e interpretación de nuevos genes en la Displasia Ectodérmica”** .Entidades financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Expediente; PI17/00796.

ANEXO 2. COMITÉ DE ÉTICA



Arrixaca
Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"
Ctra. Madrid - Cartagena • Tel. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 26/06/2017, acta 06/2017 ha evaluado la propuesta de la investigadora **Dra. Encarna Guillén Navarro** referida al estudio:

Título: Implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico e identificación de nuevos genes en la Displasia Ectodérmica

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Lo que firmo en Murcia, a 26 de junio de 2017

Fdo:

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

ANEXO 3. CONSENTIMIENTO DE CESIÓN AL BIOBANCO.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo 1* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo 1* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte de la Plataforma Red Nacional de Biobancos, como nodo de dicha Plataforma del Instituto de Salud Carlos III con la referencia *PT13/0010/0018*, y esta registrado en el Registro Nacional de Biobancos con número de referencia **B.0000859**.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados

1



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el Comité Científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
 Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel.: 968359757 E-mail: juanp.serna@carm.es

Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Titular del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1* en los términos antes explicados, por favor, lea, complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto:.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... <p style="text-align: center; color: #ccc;">Etiqueta Identificativa Paciente</p> Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Nombre y apellidos del testigo que firma..... DNI.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1* en los términos antes explicados, por favor, lea complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanc-Mur Nodo 1**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.
 SI NO
2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....
3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:
4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI:.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1* en los términos antes explicados, por favor, lea, complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

- Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.
 SI NO
- Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto:.....
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

- Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de D./Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo 1**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO 4. CUESTIONARIO CLÍNICO



Cuestionario Clínico: DISPLASIA ECTODÉRMICA (DE)

1. IDENTIDAD DEL PACIENTE

Apellidos:	Nombre:
Dirección:	
Código postal:	Ciudad:
Teléfono/Fax:	C. electrónico:
Fecha de realización del cuestionario(dd/mm/aa):	
Fecha de nacimiento (dd/mm/aa) y edad actual:	
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	
Origen (región de nacimiento):	
Origen familiar materno:	
Origen familiar paterno:	

2. DIAGNÓSTICO

Diagnóstico específico, si lo tiene:
Edad al diagnóstico y especialista que le diagnosticó:
<input type="checkbox"/> Resultado Citogenético (cariotipo/array CGH):
<input type="checkbox"/> Estudio genético molecular realizado hasta la fecha:
Resultado:

3. GENEALOGÍA

¿Se trata del individuo enfermo?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Si no, describir grado de parentesco con el enfermo (nombre del enfermo):	
¿Existe consanguinidad entre los padres del individuo descrito?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
¿Existen otros familiares afectados, vivos o fallecidos?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Especifique su parentesco, nombre y problemas (árbol familiar si es posible):	
Datos clínicos de los padres del probando*:	
Padre:	
Anomalías en los dientes	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Anomalías del pelo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Anomalías del sudor	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Otras (especificar):	
Madre:	
Anomalías en los dientes	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Anomalías del pelo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Anomalías del sudor	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Otras (especificar):	
*En caso de que los padres presenten anomalía en alguna de estas tres estructuras ectodérmicas iniciar el protocolo de estudio (cuestionario, fotografías, ortopantomografía y muestra de sangre).	



4. INFORMACIÓN PERINATAL

Tipo Embarazo:	<input type="checkbox"/> Espontáneo	<input type="checkbox"/> Por reproducción asistida	
<input type="checkbox"/> Complicaciones y medicaciones:			
Parto:	<input type="checkbox"/> A término	<input type="checkbox"/> Prematuro (semanas:)	<input type="checkbox"/> Cesárea
APGAR:			
Al nacimiento:	Peso:	Talla:	Perímetro cefálico: (cm)
Actual:	Peso:	Talla:	Perímetro cefálico: (cm)

5. INFORMACIÓN CLÍNICA (Adjuntar copia de los informes clínicos y fotos)

Problemas de regulación térmica:		<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Ausencia de sudor	HP:0000970	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Poco sudor	HP:0000966	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Intolerancia al calor	HP:0002046	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Hiperhidrosis palmar	HP:0006089	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Fiebre recurrente (>1 episodio) sin foco infeccioso	HP:0001945	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Crisis convulsivas coincidentes con aumento de la temperatura	HP:0001250	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Otras complicaciones neurológicas por aumento de la temperatura (cuales):		

Anomalías del pelo:			<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
	Ausente	Escaso	Normal
Cuero cabelludo	HP:0001596 <input type="checkbox"/>	HP:0011357 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vello corporal	HP:0001596 <input type="checkbox"/>	HP:0001006 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cejas	HP:0000535 <input type="checkbox"/>	HP:0000535 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pestañas	HP:0000561 <input type="checkbox"/>	HP:0000653 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pelo ralo	HP:0000421 <input type="checkbox"/>	Pelo fino y quebradizo	HP:0002299 <input type="checkbox"/>
Otras anomalías:			

Anomalías en la erupción de la dentición:														
	DERECHA							IZQUIERDA						
Dientes ausentes	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7
Mandíbula														
Maxilar														

Anomalías bucales, labio-palatinas y dentales:		<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Se nota la boca seca	HP:0000217	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Lengua lisa	HP:0030810	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Fisura labial	HP:0000204	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Malformaciones labio-palatinas:	HP:0000202	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Implantes dentales :		
Ausencia de dientes :		<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
	HP:0000964 <input type="checkbox"/> Ausencia completa	
	HP:0000677 <input type="checkbox"/> Oligodontia (ausencia de >6 dientes)	
	HP:0000668 <input type="checkbox"/> Hipodontia (ausencia de <6 dientes)	



Número y posición de los dientes ausentes:	
Edad de erupción dental:	
Forma de los dientes:	<input type="checkbox"/> Cónica HP:0000698 <input type="checkbox"/> Microdentía HP:0000691 <input type="checkbox"/> Normal

Anomalías cutáneas:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Piel seca	HP:0000958	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Dermatitis atópica	HP:0001047	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Eczemas	HP:0000964	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Baja sensibilidad al tacto	HP:0010830	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Queratitis palmo-plantar	HP:0000972	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Eritema o eritrodermia	HP:0010783	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Telangiectasia facial	HP:0100585	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Tumor en la piel	HP:0008069	Tipo:	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Otras anomalías (como melanocitos), especificar:			

Anomalías de las uñas:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Uñas pequeñas	HP:0001792	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Uñas frágiles	HP:000180	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Uñas ausentes manos	HP:0001817	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Uñas ausentes pies	HP:0001802	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Uñas cóncavas	HP:0001598	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Otras anomalías:			

Características cráneo-faciales:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Fronte abombada	HP:0002007	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Hiperpigmentación periocular	HP:0001106	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Arrugas periorcarias	HP:0000607	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Puente nasal aplanado	HP:0005280	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Nariz pequeña	HP:0000232	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Labio superior prominente y evertido	HP:0010803	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Labio inferior prominente y evertido	HP:0000232	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Otras anomalías:			

Visión:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Sequedad ocular	HP:0001097	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Ausencia de lágrimas en el llanto	HP:0000522	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Fotofobia (molestias por la luz)	HP:0000613	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Úlceras corneales	HP:0012804	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Quistes en los párpados	HP:0010604	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Otros defectos (ceguera, miopía, etc):			

Audición:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Tapones de cera		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Cera muy abundante en el oído		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Sordera:		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO



<input type="checkbox"/> neurosensorial	HP:0000407		
<input type="checkbox"/> conductiva	HP:0000405		
Otras anomalías (como malformaciones auriculares), especificar:			
Anomalías en otras estructuras de origen ectodérmico:			
Alteraciones en glándulas mamarias	HP:0100783	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Problemas de tiroides	HP:0000820	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Trastornos del timo	HP:0000777	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Anomalías en otras estructuras embrionarias:			
Malformaciones en extremidades	HP:0040064	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Malformaciones musculoesqueléticas	HP:0040290	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Desarrollo psicomotor:			
Retraso del desarrollo psicomotor	HP:0001263	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Deambulación:	meses		
Primeras palabras:	meses		
Precisa logopeda	HP:0000750	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Retraso global	HP:0001263	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
CI si lo tiene y escala:			
Mal rendimiento escolar	HP:0001249	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Alteraciones de comportamiento	HP:0000708	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Otros:			
Déficit inmunitario	HP:0002721	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
<input type="checkbox"/> celular	HP:0002843	<input type="checkbox"/> humoral	HP:0011111
Infecciones recurrentes (>3 episodios/año)		<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
	<input type="checkbox"/> Otitis	HP:0000403	
	<input type="checkbox"/> Rinitis	HP:0012384	
	<input type="checkbox"/> Bronquitis	HP:0002837	
	<input type="checkbox"/> Neumonías	HP:0006532	
	<input type="checkbox"/> Otras:		
Asma	HP:0002099	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Voz ronca	HP:0001609	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Dificultades para tragar	HP:0002015	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
especifique en qué época de la vida:			
Reflujo gastroesofágico	HP:0002020	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Vómitos frecuentes (≥ 3 episodios/trimestre)	HP:0002572	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Fallo de medro (aplanamiento curva crecimiento)	HP:0001510	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Retraso del desarrollo sexual	HP:0008187	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Ausencia de olfato (anosmia)	HP:0000458	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Sangrados nasales en infancia	HP:0000421	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Anomalías mamarias:			
<input type="checkbox"/> Pezones ausentes	HP: 0002561	<input type="checkbox"/> Pezones hipoplásicos	HP: 0002557
<input type="checkbox"/> Pezones supernumerarios	HP:0002558		



Ausencia de dedos	HP:0009380	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Polidactilia	HP:0010442	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Especificar:		
Otras anomalías o problemas de salud:		

6. INFORMACIÓN DEL MÉDICO/S QUE LE ATIENDE/N REGULARMENTE

Nombre / Lugar de trabajo / Especialidad / Tfno:

7. DATOS DE LA PERSONA QUE RELLENA EL CUESTIONARIO

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono/Coreo electrónico: _____

Nota: Adjuntar copia de los informes clínicos y genéticos que disponga.

ARBOL FAMILIAR:

ANEXO 5. PROTOCOLO TOMA DE MUESTRA Y ENVÍO

**PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA Y ENVÍO DE DOCUMENTACIÓN**

Si ha seleccionado un paciente para incluirlo en dicho proyecto tiene que seguir el siguiente protocolo:

1. Recogida de la historia familiar y de los informes clínicos y genéticos del paciente.
2. Cumplimentación los siguientes documentos:
 - 1) Cuestionario clínico: DISPLASIA ECTODÉRMICA (DE).
 - 2) Consentimiento informado (CI) para cada paciente (según la edad, CI-ED adulto o CI-DE menores).
 - 3) CI para Estudio Genético mediante Técnicas de Secuenciación Masiva (NGS).
 - 4) Autorización para el mantenimiento de muestras en el Bio-Banco.
3. Tomar fotografía de cara (frente perfil), dientes, cuerpo entero, manos y pies.
4. Adjuntar ortopantomografía para determinar el número de dientes ausentes y su posición (solicitarla si no se dispone de ella y remitirla posteriormente).
5. Realizar extracción de sangre en **2 tubos con anticoagulante EDTA de 3mL**.
6. Contactar telefónicamente con la Sección de Genética Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) que te gestionarán el envío de la muestra y toda la documentación recopilada a través de un servicio de mensajería que hemos contratado. Los envíos deberán realizarse de lunes a miércoles teniendo en cuenta los días festivos en la Región de Murcia.

(Año 2015: 9 Junio día Región de Murcia, 15 Septiembre día Romería, 12 Octubre día Hispanidad, 7 Diciembre día de la Constitución y 8 Diciembre día de la Inmaculada / Año 2016: 6 Enero día de Reyes, 29 de Marzo día del Bando, 2 Mayo día del trabajo, 9 Junio día Región de Murcia, 13 Septiembre día Romería, 12 Octubre día Hispanidad, 1 Noviembre día de todos los Santos, 6 Diciembre día de la Constitución y 8 Diciembre día de la Inmaculada).

El envío de cualquier documentación que no se encuentre en soporte de papel (fotografías, informes, etc) se realizará a la siguiente dirección de e-mail: fis2015deh@gmail.com

Los teléfonos y dirección de los contactos a los que puede recurrir son los siguientes:

M^a Carmen Martínez: e-mail: mcarmen.martinez16@carm.es / Laboratorio: 968 38 12 72; Móvil: 661 77 82 63

Guillermo Glover: e-mail: guillermo.glover@carm.es / Laboratorio: 968 38 12 73

María Barreda: e-mail: mbarreda@ucam.edu / Laboratorio: 968 27 86 03; Móvil: 659 32 49 00

Encarna Guillen (IP): e-mail: encarna.guillen@gmail.es / Consulta: 968 36 90 42

Dirección: **Sección de Genética Médica. Servicio de Pediatría.
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
Ctra Madrid-Cartagena s/n, 30120 El Palmar, Murcia**

Nota: Este protocolo se ha diseñado para el estudio de la Displasia Ectodérmica Hipohidróica, aunque quisiéramos continuar con esta línea de trabajo, por lo que si se le presentan otros tipos de displasias a los que le quiera hacer el estudio genético, puede enviarlo del mismo modo. En estos casos, el resultado se podría demorar varios meses.



Protocolo de toma de muestra y envío. Expediente N°PI14/01259

Versión 15 de Abril 2015

ANEXO 6. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES

Secuencias de oligonucleótidos cebadores por pares (F y R), utilizados para la amplificación de cada exón de los genes *EDA*, *EDAR*, *EDARADD*, *WNT10A* y para el cebador universal M13.

FAI	OLIGONUCLEÓTIDO CEBADOR 5'-3'	TAMAÑO (pb)	COORDENADAS (CRcH37,p13)
<i>EDA_Ex1</i>	F-ACAGTAGCCGCCTGTCAGAG R-TAAATTGGCTCGAGGTTGCT	578 pb	<i>chrX</i> :69616223 +69616809
<i>EDA_Ex2</i>	F-CTGAGTGGGGTCAACCTTTG R-CACCATGCCCTACCAAGAAG	242 pb	<i>chrX</i> :69956982 +69957223
<i>EDA_Ex3</i>	F-GGCTGTGAGACTCCCTCAAA R-CAAAAATCGCACTCTTGATTT	226 pb	<i>chrX</i> :70023098 +70023323
<i>EDA_Ex4</i>	F-TGGGCAACAGAGCAGGAC R-GCTCTCAGGATCACCCACTC	318 pb	<i>chrX</i> :70027797 +70028114
<i>EDA_Ex5</i>	F-GGTGAGGGGAAAAGGAAGTC R-AATCTCCGGGGTGTTCAT	214 pb	<i>chrX</i> :70029444 +70029657
<i>EDA_Ex6</i>	F-AGGATGGAAACATGGGACTG R-AGGGGAGAAGCTCCTCTTTG	177 pb	<i>chrX</i> :70030389 +70030565
<i>EDA_Ex7</i>	F-TGTTGCCTCGATTATTCTGACA R-CCGGATCTGCATTCTGGATA	237 pb	<i>chrX</i> :70033343 +70033579
<i>EDA_Ex8</i>	F-CCCACCCTCTTTCTCTC R-TCCACAGCAGCACTTAGAGGT	388 pb	<i>chrX</i> :70035305 +70035692
<i>EDAR_Ex1</i>	F-AACCCTCTGAGCAGGAGAAA R-ACAGCTGAAGAGGCCAAGAA	447 pb	<i>chr2</i> :109547341- 109547787
<i>EDAR_Ex2</i>	F- GTGATCAACCAGGAGCCACT R- TCTGCCATCAATCTCAACG	467 pb	<i>chr2</i> :109546421- 109546887
<i>EDAR_Ex3</i>	F- CAGAGCATGAGCTGGTTCCT R- GCAGTATCCATGACCCCTGT	457 pb	<i>chr2</i> :109545555- 109546011
<i>EDAR_Ex4</i>	F- CAGCCACCAGAGAGAGGAAC R- CCTTCATAGACCTGCCTGGA	518 pb	<i>chr2</i> :109539660- 109540177
<i>EDAR_Ex5</i>	F- CAGCGTCTTTGAAGTGGA R- CCTCCTCAATCCCTTCTTCC	520 pb	<i>chr2</i> :109528690- 109529279
<i>EDAR_Ex6-7-8</i>	F- AGTCCTGGAGGGAAGACCA R- TGCTCAGGATCCACAGGAC	735 pb	<i>chr2</i> :109526861- 109527595
<i>EDAR_Ex9</i>	F- GAAGCCACCGGTGTATGTCT R- CGTCTTGCAAGAGAGCTGAT	450 pb	<i>chr2</i> :109524218- 109524667
<i>EDAR_Ex10</i>	F- CGTCTCTGGTGTGGGCGTA R- GCCATTCTGACCAAAGTGCG	308 pb	<i>chr2</i> :109522628- 109522935
<i>EDAR_Ex11</i>	F- GGTGGCTTTCTGCATGTTTT R- ACAGGCGAGCATCTGAAAGT	676 pb	<i>chr2</i> :109513146- 109513821
<i>EDARADD_Ex1</i>	F- CTATCCGAAGGCAGACCAAG R- TGAGAACACGTTGGAATTGG	537 pb	<i>chr1</i> :236557574+ 236558110
<i>EDARADD_Ex2</i>	F- GCAAACCCGCTCTATTTGTT R- AGCCTGGAGAAACCCAAAGT	285 pb	<i>chr1</i> :236572476+ 236572760
<i>EDARADD_Ex3</i>	F- CTGCCCAGAACACATGCTTA R- GGTCGACTAGTGCTTTGTCA	513 pb	<i>chr1</i> :236577158+ 236577669

<i>EDARADD_Ex4</i>	F- GGCAGCATGTGACACTGAAC R- TGCTACCTTACTGGGATGCTT	323 pb	<i>chr1:236590587+</i> <i>236590909</i>
<i>EDARADD_Ex5</i>	F- CAAGATCCAGTCCCTCCACC R- GTGCACCGCAGGTAGAAAGT	618 pb	<i>chr1:236631402+</i> <i>236632019</i>
<i>EDARADD_Ex6</i>	F- GCTTTTGACAATTCAGCAGGA R- GTCCACTGTTCCACGTCCTT	594 pb	<i>chr1:236645470+</i> <i>236646063</i>
<i>WNT10A_Ex1</i>	F-AGTCCCACTGGGCTGTGA R-TCTACCCCAGCAAGAGCATC	249 pb	<i>chr2:218880943</i> <i>+218881191</i>
<i>WNT10A_Ex2</i>	F-CGTTGGGACAGAGTGTGTGT R-CTGAGGTGGAGATGCTGGAT	400 pb	<i>chr2:218882078</i> <i>+218882477</i>
<i>WNT10A_Ex3</i>	F-AGAAAGGTGGGCTGGAGAAT R-GGCCCTAGGCAAAGAGATTT	499 pb	<i>chr2:218889913</i> <i>+218890411</i>
<i>WNT10A_Ex4</i>	F-GGAGTGGGTTTCAGAAGCAG R-CCAAGACCGTAAGCCTCAGA	661 pb	<i>chr2:218892684</i> <i>+218893344</i>
<i>M13</i>	F-GTTGTA AAAACGACGGCCAGT R-CACAGGAAACAGCTATGACC		

ANEXO 7. CONSENTIMIENTOS DE PARTICIPACIÓN



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO: **"Implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico e identificación de nuevos genes en la Displasia Ectodérmica"**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Encarna Guillen-Navarro. Jefe de la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA). Tlf contacto consulta: 968369042.

Como padre o tutor del menor de 18 años, o intelectualmente discapacitado, invitado a participar en este estudio, usted deberá tener en cuenta que la palabra "usted" en este documento se refiere a su hijo.

Este documento de consentimiento informado describe el presente estudio, además le ayudará a decidir si desea o no participar en esta investigación. Este documento proporciona información importante acerca de los requerimientos y preguntas a los cuales estará sujeto durante el estudio. Asimismo, proporciona información sobre los riesgos y beneficios, y también sobre sus derechos como participante de este estudio de investigación. Al firmar este formulario, usted está de acuerdo en participar en este estudio.

Si usted tiene cualquier duda acerca de este formulario o desea obtener más información acerca del estudio o cualquier otra cuestión consulte con el equipo de investigación.

Le sugerimos que usted consulte con su familia y/o amigos acerca de su participación en este estudio.

No se comprometa a participar en este estudio a menos que el equipo de investigación haya respondido a todas sus preguntas. Usted tiene el derecho de decidir si quiere o no ser parte del presente estudio.

¿CUÁL ES LA FINALIDAD DE ESTE ESTUDIO?

Este estudio tiene una doble finalidad, por un lado, definir las variables clínicas relevantes para el diagnóstico de las Displasia Ectodérmicas (DE) y por otro lado, identificar su base molecular. Se realizarán los análisis genéticos apropiados para la detección de todas las mutaciones posibles responsables de la DE. Estos estudios nos ayudarán a establecer una correlación fenotipo-genotipo que nos aporte un mayor conocimiento de la enfermedad.

Le invitamos a participar en este estudio porque su hijo-a presenta características clínicas compatibles con DE. La participación en este estudio científico no debe remplazar ninguna visita médica específica o de rutina.

¿CÓMO SE DESARROLLARÁ ESTE ESTUDIO?

En caso de que desee participar en el estudio se le evaluará clínicamente y se le tomará una muestra de sangre para realizar las pruebas de laboratorio necesarias para el estudio. En primer lugar, se realizará un estudio genético mediante secuenciación masiva de un panel de genes implicados en las DE. En el caso de que el panel de genes no permita identificar el defecto genético subyacente a la DE, se procederá a la secuenciación del genoma completo.





Se requiere la realización de ortopantomografía y la toma de fotografías clínicas para tener un registro gráfico de los signos de la enfermedad y para su potencial publicación en revistas científicas y/o médicas, si así lo autoriza.

Autorizo la recogida de las muestras sanguíneas necesarias para la realización del estudio:

SI
NO

Autorizo la realización de fotografías clínicas para el estudio:

SI
NO

Autorizo la publicación de las fotografías clínicas tomadas en revistas científicas y/o médicas, con preservación de mi identidad.

SI
NO

Tengo el derecho a revocar la autorización para publicar mis fotografías en cualquier momento. Para esto, deberá contactar con el médico a cargo del estudio.

¿CUÁNTAS PERSONAS PARTICIPARÁN DE ESTE ESTUDIO?
Se estima una participación de 75 personas en este estudio.

¿CUÁL ES LA DURACIÓN del ESTUDIO?
El estudio no requiere de mucho tiempo, el necesario para informarle acerca de él, firmar el consentimiento informado, evaluarlo clínicamente y tomar una fotografía y extracción sanguínea.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE ESTE ESTUDIO?
No existe ningún riesgo al participar en este estudio científico.
La recogida de la muestra de sangre es un procedimiento muy sencillo que consiste pinchar en una vena periférica, habitualmente del brazo y extraer de 6-10 ml de sangre. Los riesgos asociados con la punción venosa son leves e infrecuentes (hematoma en el punto de punción, desmayo o sensación de mareo). El personal asistirá cualquier eventualidad si es necesario.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO?
Su participación en este estudio puede beneficiarle en el caso de que sea diagnosticado de una mutación en los genes analizados, al proporcionarle, además del diagnóstico, información más precisa sobre el pronóstico de la enfermedad y el estudio de otros miembros de la familia, así como un diagnóstico prenatal y un asesoramiento genético adecuado.

¿CUÁL ES EL COSTE DE ESTE ESTUDIO?
Usted no deberá pagar por participar en este estudio. La participación en este estudio es voluntaria y gratuita. Tampoco recibirá ningún tipo de compensación económica.



¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS?

Todos los datos relativos a este estudio serán tratados con carácter confidencial de acuerdo a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y su desarrollo en el Real Decreto 1720/2007 de 21 de Diciembre.

Sólo el equipo investigador tendrá acceso a sus datos personales y clínicos. Sus datos clínicos sólo serán divulgados de manera anónima, y aparecerán codificados en la base de datos.

La participación en este estudio es voluntaria, teniendo usted la potestad de retirarse del mismo en cualquier momento.

Al firmar este documento informativo, usted otorga su consentimiento para que sus datos personales sean procesados de la manera expuesta. Usted tendrá derecho en todo momento a acceder a la información que la base de datos tiene sobre usted a través de su médico. Usted también tendrá derecho a exigir la corrección de la información cuando ésta sea errónea.

Si tiene alguna duda, puede contactar con los investigadores implicados en el estudio.

¿ES ESTE ESTUDIO VOLUNTARIO?

La participación en este estudio de investigación es completamente voluntaria. Usted puede optar por participar o no de este estudio. Aún cuando usted decida participar en este estudio, en cualquier momento puede dejar de participar si así lo desea. Si usted decide no participar en este estudio, o si usted deja de participar en cualquier momento, usted no será penalizado ni perderá ningún beneficio por participar en otro estudio.

¿QUÉ PASA SI DECIDO RENUNCIAR AL ESTUDIO?

Usted puede renunciar o retirarse del estudio simplemente comunicando al equipo de estudio que ya no está interesado en la participación en este estudio. Alternativamente, usted podrá enviar una carta de renuncia a la participación de este estudio.

¿RECIBIRÉ INFORMACION DURANTE LA PARTICIPACION DE ESTE ESTUDIO?

Se le proporcionará cualquier nueva información de este estudio que pueda afectar a su deseo de continuar participando en él.

¿PUEDE ALGUIEN MÁS TERMINAR MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

El investigador puede retirarle del estudio sin su previo consentimiento. El investigador compartirá cualquier información nueva que pueda afectar al deseo de continuar o no en el estudio.

¿QUÉ PASA SI TENGO MÁS PREGUNTAS?

Sugerimos que efectúe más preguntas. Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio científico en sí, por favor contacte con el equipo investigador en los teléfonos indicados.

Este formulario de consentimiento no es un contrato. Se trata de un conjunto de explicaciones por escrito de lo que sucederá durante el estudio si usted decide participar. Aceptando participar en este estudio usted no está renunciando a ningún derecho legal.

Su firma indica: que se la ha explicado a usted los requerimientos y procedimientos de este estudio, que sus inquietudes y preguntas han sido contestadas, y que se compromete a participar en este estudio. Usted recibirá una copia firmada de este formulario.



Padre / Tutor Nombre y Relación con el participante:

Nombre del menor o del discapacitado intelectualmente:

Firma del padre/madre o tutor:

Nombre del padre/madre o tutor:

Firma del menor si es ≥ 12 años:

Nombre del menor:

Declaración de la persona que obtuvo el consentimiento.

La información contenida en este documento ha sido explicada y discutida con el participante o, en su caso, con el representante legal autorizado del participante. El participante ha indicado que entiende los riesgos, beneficios y procedimientos relacionados con la participación en este estudio de investigación.

(Firma de la persona que obtuvo el consentimiento)

(Fecha)

(Nombre de la persona que obtuvo el consentimiento)



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO: **“Implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico e identificación de nuevos genes en la Displasia Ectodérmica”**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Encarna Guillen-Navarro. Jefe de la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA). Tlf contacto consulta: 968369042.

Este documento de consentimiento informado describe el presente estudio, además le ayudará a decidir si desea o no participar en esta investigación. Este documento proporciona información importante acerca de los requerimientos y preguntas a los cuales estará sujeto durante el estudio. Asimismo, proporciona información sobre los riesgos y beneficios, y también sobre sus derechos como participante de este estudio de investigación. Al firmar este formulario, usted está de acuerdo en participar en este estudio.

Si usted tiene cualquier duda acerca de este formulario o desea obtener más información acerca del estudio o cualquier otra cuestión consulte con el equipo de investigación.

Le sugerimos que usted consulte con su familia y/o amigos acerca de su participación en este estudio.

No se comprometa a participar en este estudio a menos que el equipo de investigación haya respondido a todas sus preguntas. Usted tiene el derecho de decidir si quiere o no ser parte del presente estudio.

¿CUÁL ES LA FINALIDAD DE ESTE ESTUDIO?

Este estudio tiene una doble finalidad, por un lado, definir las variables clínicas relevantes para el diagnóstico de las Displasias Ectodérmicas (DE) y por otro lado, identificar su base molecular. Se realizarán los análisis genéticos apropiados para la detección de todas las mutaciones posibles responsables de la DE. Estos estudios nos ayudarán a establecer una correlación fenotipo-genotipo que nos aporte un mayor conocimiento de la enfermedad.

Le invitamos a participar en este estudio porque su hijo-a presenta características clínicas compatibles con DE. La participación en este estudio científico no debe reemplazar ninguna visita médica específica o de rutina.

¿CÓMO SE DESARROLLARÁ ESTE ESTUDIO?

En caso de que desee participar en el estudio se le evaluará clínicamente y se le tomará una muestra de sangre para realizar las pruebas de laboratorio necesarias para el estudio. En primer lugar, se realizará un estudio genético mediante secuenciación masiva de un panel de genes implicados en las DE. En el caso de que el panel de genes no permita identificar el defecto genético subyacente a la DE, se procederá a la secuenciación del genoma completo.



Consentimiento Informado - Adultos. Expediente N°PI17/00796
Versión 5 Febrero 2018



Se requiere la realización de ortopantomografía y la toma de fotografías clínicas para tener un registro gráfico de los signos de la enfermedad y para su potencial publicación en revistas científicas y/o médicas, si así lo autoriza.

Autorizo la recogida de las muestras sanguíneas necesarias para la realización del estudio:

SI
NO

Autorizo la realización de fotografías clínicas para el estudio:

SI
NO

Autorizo la publicación de las fotografías clínicas tomadas en revistas científicas y/o médicas, con preservación de mi identidad.

SI
NO

Tengo el derecho a revocar la autorización para publicar mis fotografías en cualquier momento. Para esto, deberá contactar con el médico a cargo del estudio.

¿CUÁNTAS PERSONAS PARTICIPARÁN DE ESTE ESTUDIO?

Se estima una participación de 100 personas en este estudio.

¿CUÁL ES LA DURACIÓN del ESTUDIO?

El estudio no requiere de mucho tiempo, el necesario para informarle acerca de él, firmar el consentimiento informado, evaluarlo clínicamente y tomar una fotografía y extracción sanguínea.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE ESTE ESTUDIO?

No existe ningún riesgo al participar en este estudio científico.

La recogida de la muestra de sangre es un procedimiento muy sencillo que consiste pinchar en una vena periférica, habitualmente del brazo y extraer de 6-10 ml de sangre. Los riesgos asociados con la punción venosa son leves e infrecuentes (hematoma en el punto de punción, desmayo o sensación de mareo). El personal asistirá cualquier eventualidad si es necesario.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO?

Su participación en este estudio puede beneficiarle en el caso de que sea diagnosticado de una mutación en los genes analizados, al proporcionarle, además del diagnóstico, información más precisa sobre el pronóstico de la enfermedad y el estudio de otros miembros de la familia, así como un diagnóstico prenatal y un asesoramiento genético adecuado.

¿CUÁL ES EL COSTE DE ESTE ESTUDIO?

Usted no deberá pagar por participar en este estudio. La participación en este estudio es voluntaria y gratuita. Tampoco recibirá ningún tipo de compensación económica.

¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS?

Todos los datos relativos a este estudio serán tratados con carácter confidencial de acuerdo a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y su desarrollo en el Real Decreto 1720/2007 de 21 de Diciembre.



Consentimiento Informado - Adultos. Expediente N°PI17/00796
Versión 5 Febrero 2018



Sólo el equipo investigador tendrá acceso a sus datos personales y clínicos. Sus datos clínicos sólo serán divulgados de manera anónima, y aparecerán codificados en la base de datos. La participación en este estudio es voluntaria, teniendo usted la potestad de retirarse del mismo en cualquier momento.

Al firmar este documento informativo, usted otorga su consentimiento para que sus datos personales sean procesados de la manera expuesta. Usted tendrá derecho en todo momento a acceder a la información que la base de datos tiene sobre usted a través de su médico. Usted también tendrá derecho a exigir la corrección de la información cuando ésta sea errónea. Si tiene alguna duda, puede contactar con los investigadores implicados en el estudio.

¿ES ESTE ESTUDIO VOLUNTARIO?

La participación en este estudio de investigación es completamente voluntaria. Usted puede optar por participar o no de este estudio. Aún cuando usted decida participar en este estudio, en cualquier momento puede dejar de participar si así lo desea. Si usted decide no participar en este estudio, o si usted deja de participar en cualquier momento, usted no será penalizado ni perderá ningún beneficio para participar en otro estudio.

¿QUÉ PASA SI DECIDO RENUNCIAR AL ESTUDIO?

Usted puede renunciar o retirarse del estudio simplemente comunicando al equipo de estudio que ya no está interesado en la participación en este estudio. Alternativamente, usted podrá enviar una carta de renuncia a la participación de este estudio.

¿RECIBIRÉ INFORMACION DURANTE LA PARTICIPACION DE ESTE ESTUDIO?

Se le proporcionará cualquier nueva información de este estudio que pueda afectar a su deseo de continuar participando en él.

¿PUEDE ALGUIEN MÁS TERMINAR MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

El investigador puede retirarle del estudio sin su previo consentimiento. El investigador compartirá cualquier información nueva que pueda afectar al deseo de continuar o no en el estudio.

¿QUÉ PASA SI TENGO MÁS PREGUNTAS?

Sugerimos que efectúe más preguntas. Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio científico en sí, por favor contacte con el equipo investigador en los teléfonos indicados.

Este formulario de consentimiento no es un contrato. Se trata de un conjunto de explicaciones por escrito de lo que sucederá durante el estudio si usted decide participar. Aceptando participar en este estudio usted no está renunciando a ningún derecho legal.

Su firma indica: que se la ha explicado a usted los requerimientos y procedimientos de este estudio, que sus inquietudes y preguntas han sido contestadas, y que se compromete a participar en este estudio. Usted recibirá una copia firmada de este formulario.

Firma del participante:

Fecha:

Nombre del participante:



**Declaración de la persona que obtuvo el consentimiento**

La información contenida en este documento ha sido explicada y discutida con el participante o, en su caso, con el representante legal autorizado del participante. El participante ha indicado que entiende los riesgos, beneficios y procedimientos relacionados con la participación en este estudio de investigación.

(Firma de la persona que obtuvo el consentimiento)

(Fecha)

(Nombre de la persona que obtuvo el consentimiento)



CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO GENÉTICO MEDIANTE TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA

¿Qué es la secuenciación masiva?

Hasta hace poco, los estudios genéticos consistían básicamente en determinar *de forma sucesiva, uno a uno*, la secuencia del ADN de cada gen o genes causantes de una enfermedad o de un trastorno genético. La **secuenciación masiva**, como su propio nombre indica, permite determinar *de forma simultánea* la secuencia del ADN de un número variable de genes. Esto resulta particularmente útil en aquellas enfermedades o trastornos genéticos causados por múltiples y diferentes genes (por ejemplo, se conocen más de 70 genes diferentes causantes de Displasia Ectodérmica, una enfermedad que afecta a la piel, dientes y pelo). Para situaciones en las que no se dispone de una orientación clínica concreta, la secuenciación masiva resulta idónea, porque ofrece la posibilidad de estudiar la totalidad de los 22.000 genes, mediante la secuenciación del exoma, o el genoma completo, con el fin de intentar identificar la posible causa de la enfermedad o del trastorno genético.

El término secuenciación de última generación (del inglés Next Generation Sequencing, NGS) es sinónimo y equivalente al de secuenciación masiva en castellano.

¿Qué genes se estudian?

En la mayoría de los casos el estudio se limita inicialmente al análisis de un grupo o panel de genes relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha motivado el estudio. En el caso de no identificar ninguna alteración, si existe indicación médica, es posible ampliar el estudio a otros genes, pudiendo llegar al genoma completo, si el paciente lo autoriza.

En cualquier caso, y a pesar de la exhaustividad de estos estudios, es posible que no se logre encontrar la causa de la enfermedad o del trastorno genético, ya que la sensibilidad de estas pruebas no es del 100%.

¿Qué limitaciones tiene esta técnica?

Los estudios de secuenciación masiva generan una gran cantidad de datos y es preciso distinguir los que puedan ser relevantes de los que puedan no serlo. Existen además ciertas limitaciones técnicas que conviene conocer para interpretar los resultados con precisión:

Existen ciertas regiones en los genes que pueden resultar difíciles de analizar. Si esto sucediera en el análisis, se indicaría en el informe.

Si el estudio se limita al análisis de un grupo o panel de genes, únicamente se podrán detectar mutaciones en estos genes. Por tanto, mutaciones de interés en otros genes no incluidos en el panel no van a ser detectadas. El informe incluirá la lista exacta de genes analizados, así como el diseño de panel específico empleado para el estudio.



¿Cuáles son los posibles resultados de un estudio de secuenciación masiva?

Nos podemos encontrar ante cuatro situaciones posibles:

1. Que se detecte una o más alteraciones considerada/s como causante/s de la enfermedad o del trastorno genético que indicó el estudio, lo que confirmaría o aclararía el diagnóstico. En esta situación, se comentará con el paciente el alcance y las implicaciones del resultado.
2. Que se detecte una o más alteraciones de significado incierto. En este caso puede ser necesario solicitar exploraciones complementarias o estudiar a otros miembros de la familia con el fin de intentar confirmar si los hallazgos se relacionan o no con la enfermedad o el trastorno genético que motivó el estudio.
3. Que no se detecten alteraciones que puedan explicar la enfermedad o el trastorno genético.
4. Que, en el caso de que se analicen todos los genes (secuenciación del genoma completo), se detecten hallazgos incidentales o fortuitos*. Estos se definen como alteraciones detectadas de forma casual, no relacionadas con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio, pero que pueden tener implicaciones relevantes para la salud del paciente y/o de sus familiares.

¿Qué hallazgos se informan al paciente y cuáles no?

Se informan:

Hallazgos causantes o relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio.

Si el paciente o el tutor legal lo solicita y lo autoriza, hallazgos incidentales o fortuitos no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio pero que pudieran tener consecuencias importantes para la salud del paciente o de sus familiares (por ejemplo, mutaciones en genes causantes de enfermedades cardiovasculares que predisponen a muerte súbita y en genes que predisponen al desarrollo de cáncer hereditario).

No se informan:

Hallazgos de significado incierto sin relación causal aparente con el motivo del estudio.

Hallazgos que confirman la condición de portador (sano) de una mutación causante de una enfermedad o trastorno genético (por ejemplo, la fibrosis quística del páncreas).

Necesidad de revisar los resultados de los estudios de secuenciación masiva según avance el conocimiento en genética

El conocimiento sobre la función de los genes y su papel en determinadas enfermedades y trastornos genéticos avanza de forma rápida y progresiva. Una alteración genética identificada y considerada de significado incierto en la actualidad, deberá ser revisada más adelante. Por ello, en estos casos, se recomienda que, pasado un tiempo (uno o dos años), se acuda de nuevo a consulta para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial del hallazgo.

(1 También conocidos como hallazgos casuales, coincidentes, imprevistos, inesperados, no solicitados, circunstanciales, accidentales, secundarios, complementarios, no deliberados, etc.).



¿Cómo se realiza este procedimiento?:

Es necesaria una muestra de sangre (3-6 ml) o de cualquier otro tejido del que se pueda obtener ADN. La muestra de sangre se obtiene mediante una extracción sanguínea a través de una punción de una vena de la parte interior del codo o del dorso de la mano. No es necesario acudir en ayunas.

Una vez obtenida la muestra, se procede a extraer el ADN de las células (en una muestra de sangre, los leucocitos o glóbulos blancos), parte del cual se utiliza para realizar el estudio y el resto se almacena por si hubiera que repetirlo. En algunos casos puede ser necesario obtener una muestra de sangre de los padres o de otros familiares para poder interpretar los resultados.

¿Cuánto dura?: La extracción dura entre 5 y 10 minutos. El plazo estimado de resultados es variable, alrededor de 6 meses, dependiendo de la amplitud del estudio.

¿Qué objetivos persigue?: Identificar la alteración genética causante de la enfermedad o del trastorno genético.

¿Qué riesgos tiene?

1. *Riesgos generales:* Los riesgos asociados con la punción venosa son leves e infrecuentes (hematoma en el punto de punción, desmayo o sensación de mareo).

2. *Riesgos personalizados:* Además de los riesgos anteriormente citados por la/s enfermedad/es que padece puede presentar otras complicaciones:

.....

3. *Beneficios del procedimiento a corto y medio plazo:* Identificar la alteración genética causante de una enfermedad o de un trastorno genético no solamente permite confirmar el diagnóstico, sino que también puede aportar información sobre el pronóstico y posibilitar el diagnóstico prenatal y el estudio de otros miembros de la familia.

¿Qué otras alternativas hay?

No hay otras alternativas.

¿Nos autoriza?

Por este documento solicitamos de forma general la autorización para realizar el procedimiento y/o prueba mencionados, y para usar imágenes e información de la Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. El anonimato será respetado.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será tratada en conformidad con la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999 y los derechos conlleva de acceso, cancelación, rectificación y oposición.

En caso de obtener su autorización, los resultados de los estudios de secuenciación masiva serán conservados y custodiados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca – IMIB Arrixaca y podrán ser compartidos, de forma anónima sin identificadores personales, con otros grupos de investigación con el fin de aumentar el conocimiento sobre las enfermedades genéticas.





Declaraciones y firmas:

Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda sobre este procedimiento, no tenga reparo en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto. Le informamos que tiene derecho a revocar su decisión y retirar su consentimiento, solicitándolo por escrito.

1. Declaro mi conformidad con los puntos siguientes

Con respecto al alcance de la prueba y a la información de los hallazgos:

Deseo que el ADN extraído de mí / mi hijo / la persona bajo mi tutela legal sea analizado mediante técnicas de secuenciación masiva para el siguiente problema médico, y que se realice el siguiente tipo de análisis:

- Problema médico:
- Tipo de análisis:
 - Opción 1. Análisis de grupo o panel de genes. Análisis exclusivamente de los genes conocidos y relacionados con la enfermedad o el trastorno genético

- Opción 2. Análisis ampliado. Análisis de los genes conocidos y relacionados con la enfermedad o el trastorno genético, seguido de un análisis ampliado de otros genes, pudiendo llegar al genoma completo, si existe indicación médica.

Entiendo que en cualquiera de las dos opciones es posible encontrar hallazgos de significado incierto.

Si he optado por la opción 2 (análisis ampliado), entiendo que existe además la posibilidad de encontrar hallazgos incidentales o fortuitos no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha indicado el estudio:

- Deseo / No deseo ser informado de los hallazgos incidentales que se pudieran detectar y que pudieran tener consecuencias importantes para mi salud o la de mis familiares. Específicamente, los que afecten a los genes que tienen relevancia clínica
- Deseo / No deseo que la muestra se destruya una vez realizado el estudio.
- Deseo / No deseo que el excedente de la muestra de ADN conservada en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca – IMB Arrixaca, pueda ser compartida de forma anónima con otros grupos que investiguen sobre la misma enfermedad o trastorno genético.
- Deseo / No deseo a que parte de la muestra de ADN conservada en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca – IMB Arrixaca, sea utilizada de forma anónima en el proceso de desarrollo y homologación en estas pruebas genéticas.



Consentimiento Informado - NGS. Expediente N°PI17/00796
Versión 5 Febrero 2018



Entiendo que el conocimiento médico avanza con el paso del tiempo y que sería conveniente acudir de nuevo a consulta más adelante para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial de los resultados.

1. Firma del/la paciente:

D./D.^a con D.N.I.

He sido informado/a suficientemente de la intervención que se me va a realizar, y me han explicado los riesgos, complicaciones y alternativas posibles; lo he comprendido y he tenido el tiempo suficiente para valorar mi decisión. Por tanto, estoy satisfecho/a con la información recibida. Por ello, doy mi consentimiento para que se realice dicha prueba por el médico responsable y/o médico residente supervisado por facultativo especialista y a ser informado/a de los resultados según lo arriba dispuesto. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, solicitándolo por escrito, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.

Firma del paciente

Fecha: / /

2. Firma de familiar o tutores

El paciente D./Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento.

D. /D^a. con D.N.I., y en calidad de....., he sido informado/a suficientemente de la intervención que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.

Firma del tutor o familiar

Fecha: / /

3. Relativo al médico que solicita:

Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.

Firma del médico

Fecha: / /





4. **Relativo a la no aceptación (REVOCACIÓN) del Consentimiento Informado:**

D./Dña.....con D.N.I.....

He sido informado de que puedo revocar este documento previamente a la realización de la intervención, por lo que manifiesto que **NO** doy mi Consentimiento para someterme a la realización de la misma, dejando sin efecto mi Consentimiento anterior.

Deseo hacer las siguientes observaciones:

.....
.....
.....

Firma del paciente

Fecha: / /

