



Comunicación corta

Meibografía infrarroja y evaluación molecular de la mutación del gen p63 en un paciente mexicano con síndrome EEC



M. Garza-Leon^{a,b,*}, R.B.R. León-Cachón^c, R. Villafuerte-de la Cruz^d
y D.A. Martínez-Treviño^c

^a Departamento de Ciencias Clínicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Monterrey, San Pedro Garza García, Nuevo León, México

^b Destellos de Luz IBP, San Pedro Garza García, Nuevo León, México

^c Centro de Diagnóstico Molecular y Medicina Personalizada, Departamento de Ciencias Básicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Monterrey, San Pedro Garza García, Nuevo León, México

^d Biología del desarrollo, Facultad de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de marzo de 2018

Aceptado el 14 de junio de 2018

On-line el 17 de julio de 2018

Palabras clave:

Síndrome EEC

Glándulas de Meibomio

Meibografía

Mutaciones p63

R E S U M E N

Objetivo: Reportar el hallazgo de la meibografía infrarroja en un paciente mexicano con el síndrome de EEC (Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft syndrome) confirmado por análisis molecular del gen p63.

Caso clínico: Paciente varón de 31 años de edad que acude por presentar una historia de pérdida visual progresiva en ambos ojos asociada a fotofobia de larga duración. El paciente nació con labio y paladar hendido, y ectodactilia de la mano derecha; posteriormente presentó displasia ungual, anodoncia y alopecia, con lo que se diagnosticó displasia ectodérmica. Las alteraciones oftalmológicas se limitaron a los anexos y la superficie ocular. La meibografía infrarroja *in vivo* mostró la ausencia total de glándulas de Meibomio en los párpados inferiores y deficiencia severa en los párpados superiores. Además, identificamos que el paciente es un portador heterocigoto de una mutación de sentido equivocado R304W (C → T) en el exón 8 del gen p63.

Discusión: La mutación R304W en la región del gen p63 está definitivamente relacionada con características tales como la ausencia de glándulas de Meibomio.

© 2018 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: manuel@drgarza.mx (M. Garza-Leon).

<https://doi.org/10.1016/j.oftal.2018.06.005>

0365-6691/© 2018 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Infrared meibography and molecular assessment of p63 gene mutations in a Mexican patient with EEC syndrome

A B S T R A C T

Keywords:

EEC syndrome
Meibomian gland
Meibography
p63 mutations

Objective: To report the finding of infrared meibography in a Mexican patient with EEC syndrome (Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft syndrome) confirmed by molecular analysis of the p63 gene.

Clinical case: A 31 year-old male patient was seen due to a history of progressive visual loss in both eyes associated with long-term photophobia. The patient was born with cleft lip and palate, ectrodactyly of right hand, and afterwards, displayed nail dysplasia, anodontia and alopecia, with which ectodermal dysplasia was diagnosed. The ophthalmological findings were limited to the adnexa and the ocular surface. *In vivo* infrared meibography showed total absence of Meibomian glands in the lower eyelids and severe deficiency in the upper eyelids. In addition, it was shown that the patient was a heterozygous carrier of a missense mutation R304W (C → T) in exon 8 of the p63 gene.

Discussion: The R304W mutation in the p63 gene region is definitely related to characteristics such as the absence of Meibomian glands.

© 2018 Sociedad Española de Oftalmología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El síndrome de ectrodactilia, displasia ectodérmica y labio/paladar hendido (EEC) es una enfermedad autosómica dominante que causa múltiples anomalías caracterizadas por malformación en las extremidades distales, las cuales recuerdan la extremidad de las langostas, displasia ectodérmica y labio y paladar hendidos. Muestra diversidad en el fenotipo clínico, que refleja variaciones en el gen p63¹. En Europa, América del Norte y México las mutaciones R204, R227, R279, R280 y R304 en el exón 8 representan más del 86% de los casos de EEC².

La diversidad clínica puede incluir algunas anomalías oculares, tales como dacriocistitis, estenosis o agenesia del punto lagrimal, conjuntivitis recurrente, cicatrización conjuntival, pannus con fotofobia, cicatrización corneal, entropión, triquiasis y madarosis²⁻⁴. Las alteraciones posteriores de la superficie ocular y la deficiencia de células del limbo son un sello distintivo del síndrome EEC³. Además de estas anomalías, unos pocos artículos han reportado la asociación de glándulas de Meibomio deficientes o ausentes con la displasia ectodérmica^{4,5}. Dado que la ausencia congénita de las glándulas de Meibomio es extremadamente rara³, esta alteración también puede ser una característica importante del síndrome EEC.

La meibografía es una técnica de diagnóstico que permite la evaluación *in vivo* de la cantidad y morfología de las glándulas de Meibomio, descrita por primera vez por Tapie en 1977⁶.

Aunque la ausencia de glándulas de Meibomio en pacientes con síndrome EEC ya ha sido reportada con base en la evaluación biomicroscópica, la interferometría de la capa lipídica e incluso la biopsia del párpado⁴, según nuestro conocimiento no existen informes previos en la literatura de meibografía IR para evaluación *in vivo* en pacientes con síndrome EEC y su correlación con alteraciones en el gen p63.

Caso clínico

Se trata de un paciente varón de 31 años de edad con pérdida visual progresiva en ambos ojos asociada a fotofobia. La evaluación sistemática demostró ectrodactilia de la mano derecha (fig. 1A), cicatriz quirúrgica de reparación de labio leporino y paladar hendido (fig. 1B, D) y displasia ectodérmica que se manifiesta como piel seca, cabello escaso, uñas displásicas y anodoncia (fig. 1B, C).

Tenía antecedentes de intubación infructuosa del sistema lagrimal en ambos ojos en la infancia y cuadros previos de dolor, ojos rojos, fotofobia y lagrimeo tratado con lubricantes desde los 7 años.

En la evaluación inicial su agudeza visual fue de 20/60 en el ojo derecho (OD) y 20/50 en el ojo izquierdo (OS). Los hallazgos oftalmológicos se limitaron a los anexos y la superficie ocular. El examen externo mostró la ausencia de orificios de las glándulas de Meibomio, triquiasis, madarosis y estenosis del punto lagrimal. La superficie ocular presentaba fibrosis conjuntival subepitelial, vascularización corneal superficial y cicatrización corneal central y vascularización estromal en OD (fig. 2 a, b; RE y c, d; LE). La tinción con fluoresceína mostró erosiones punteadas superficiales en ambos ojos, con una tinción con fluoresceína de 8 puntos (SICCA Score); la prueba de rotura del tiempo lagrimal fue de 0 s en ambos ojos. El test de Schirmer 1 sin anestesia fue de 15 mm en OD y de 12 mm en OS.

Meibografía

La meibografía de no contacto se realizó con el topógrafo Antares® (CSO, Florencia, Italia), topógrafo de disco de Plácido con una cámara infrarroja de alta resolución y un LED IR (890 nm). Después de la eversión del párpado superior o inferior, se adquiere una imagen de las glándulas de Meibomio y posteriormente se analiza mediante un software (Phoenix®,



Figura 1 – Hallazgos sistémicos: A) ectrodactilia de la mano derecha; B) pelo frontal escaso, grueso y telecano; C) en la mano izquierda, uñas delgadas con líneas marrones; D) apertura de la boca limitada, cicatrices en la cirugía secundaria a la reparación de hendidura de labio y paladar y oligodoncia.

CSO, Florencia, Italia); esta maniobra se repitió en todos los párpados.

Análisis molecular del gen p63

Se extrajo la sangre periférica de los miembros de la familia (paciente afectado, padre, madre y hermano) en un tubo con EDTA. El ADN genómico se aisló usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, Madison, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el ADN se cuantificó por absorbancia UV usando Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.) y se almacenó a -20 °C hasta el análisis.

Para analizar la presencia de mutaciones en los exones 4, 5, 6 y 7 del gen p63, las muestras de ADN extraídas se amplificaron por PCR usando secuencias de cebador previamente informadas⁵. Sin embargo, se diseñó un nuevo conjunto de cebadores para analizar la región del exón 8 (cebador directo [5'-GGTTCTTGGAGAACAAATGG-3'] y cebador inverso [5'-TGTTGTGGAAGTCACATTG-3']). El protocolo de PCR se ha descrito anteriormente². Los amplicones se purificaron utilizando QIAquick® (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se sometieron a secuenciación en un analizador genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.), por un proveedor externo, el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (San Luis Potosí, México). Las secuencias se editaron y analizaron en el software CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Corporation, Centerville, EE. UU.).

Se realizó un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR para confirmar la mutación R304W en el exón 8. También se llevó a cabo una nueva amplificación a

partir de este producto de PCR. La digestión se realizó a continuación con la enzima de restricción Mpls (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.).

Resultados

Meibografía infrarroja

La meibografía infrarroja demostró una ausencia total de glándulas de Meibomio en el párpado inferior (fig. 2 e, f) y la presencia de pocas glándulas de Meibomio, además de pequeñas, finas y tortuosas, en la parte central del párpado superior en ambos ojos (fig. 2g y h).

Análisis molecular del gen p63

Varias mutaciones se han informado anteriormente en los exones 4, 5, 6, 7 y 8 del gen p63, que están asociados con el síndrome EEC¹. Analizamos estas regiones de ADN en todos los miembros de la familia: madre, padre, hijo afectado con síndrome EEC y hermano. El análisis de secuencia mostró la ausencia de mutaciones en los exones 4, 5, 6 y 7. Sin embargo, la mutación sin sentido R304W (C → T) en el exón 8 se identificó en el sujeto afectado como portador heterocigoto (fig. 3A). El resto de los miembros de la familia no mostraron ningún cambio en el exón 8. La presencia de esta mutación se confirmó con el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR (fig. 3B y C).

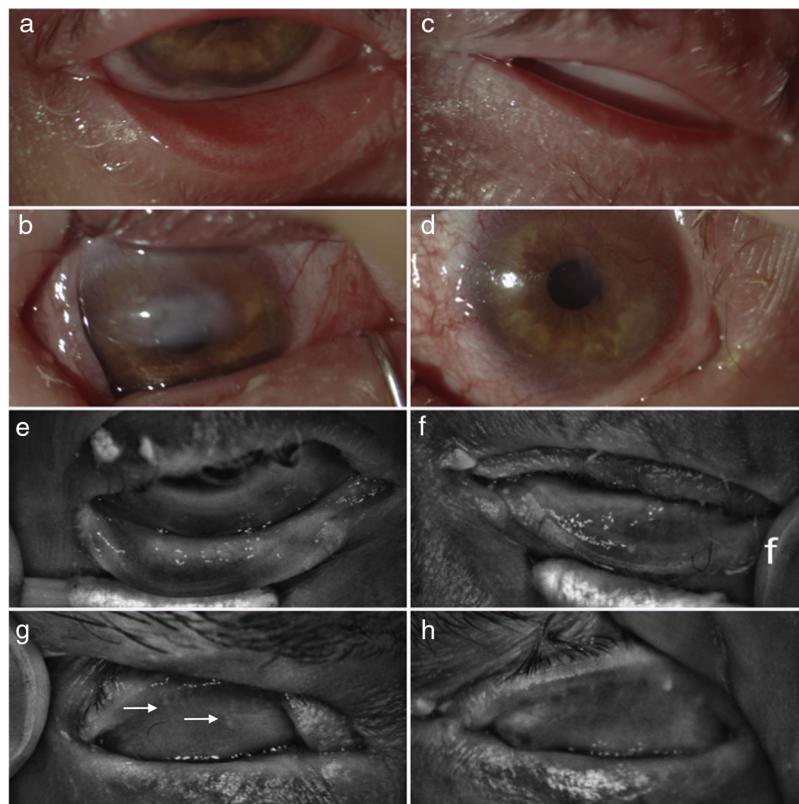


Figura 2 – Imagen clínica de OD (a) y OS (c) que muestra la ausencia de orificios de la glándula de Meibomio, triquiasis, madarosis y estenosis del punto lagrimal y ojo izquierdo. La fotografía del OD mostró una cicatriz corneal con neovascularización (b) y una neovascularización superior del OS (d). Meibografía infrarroja del párpado inferior del OD con ausencia total de glándula de Meibomio (e), el párpado superior mostró algunos pequeños tubos hiperreflectantes correspondientes a las glándulas de Meibomio identificados por las flechas (g). El OS demostró las mismas características del OD (f, h).

Discusión

El síndrome EEC resulta de una anormalidad del desarrollo que afecta simultáneamente los tejidos ectodérmico y mesodérmico. Las alteraciones oftálmicas pueden estar presentes en el recién nacido, pero en los primeros años las características sistémicas son los principales rasgos de discapacidad. A pesar del origen ectodérmico del cristalino y el epitelio corneal, el desarrollo de la neovascularización y cicatrización corneal no se debe a una malformación de la córnea secundaria a la displasia ectodérmica *per se*, porque las manifestaciones se vuelven predominantes durante la adultez temprana⁷; este es el caso de nuestro paciente, que tiene una historia de inflamación recurrente y crónica de los márgenes palpebrales, superficie ocular y película lagrimal defectuosa con fase lipídica insuficiente⁸ debido a la aplasia de las glándulas de Meibomio. Otra causa de cicatrización corneal y pannus, según los informes de Di Iorio et al.³, podría ser una deficiencia de células del limbo, que se ha informado en el 61% de los casos. Una vez que se ha desarrollado la cicatriz corneal, la queratoplastia tiene un mal pronóstico debido a la displasia ectodérmica, la ausencia de glándulas de Meibomio y la película lagrimal defectuosa,

por lo que la prevención del desarrollo de cicatrices corneales es el mejor tratamiento disponible hasta el momento.

La identificación de la ausencia de las glándulas de Meibomio y la deficiencia de la capa lipídica de la película lagrimal secundaria mediante meibografía podría ayudarnos a hacer un diagnóstico precoz del ojo seco evaporativo como la principal causa del ojo seco en este grupo de pacientes que nos guía para iniciar un tratamiento apropiado con el fin de mejorar el pronóstico, de acuerdo con Ota et al.⁸, quienes informan el uso exitoso de la aplicación de pomada a base de lípidos (0,05 g de pomada de ofloxacina 2 veces al día).

La mutación R304W encontrada en el individuo afectado es uno de los cambios de nucleótidos más comunes en el exón 8 del gen p63 que representa los casos de EEC². La arginina en esta posición cambia por el triptófano, haciendo que la proteína sea deficiente en su función de transcripción⁹. Como se mencionó, los fenotipos entre los pacientes afectados con síndrome EEC comparten ciertas características. Sin embargo, características específicas tales como labio leporino, paladar hendido, extrodactilia y atresia del conducto lagrimal se han asociado en mayor proporción a la presencia de la mutación R304W⁸. Además, más del 60% de los casos de EEC se deben a mutaciones *de novo*⁷, como el caso presentado en nuestro estudio.

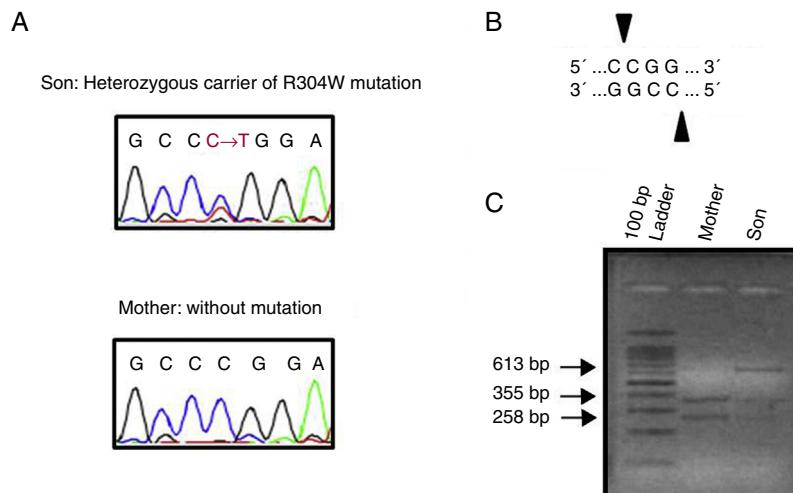


Figura 3 – A) Secuencias de nucleótidos de una región en el exón 8 del gen p63. La mutación R304W está presente en el paciente con síndrome EEC pero no en su madre. La mutación está marcada con rojo: C → T. La secuencia de nucleótidos de la madre, el padre y el hermano del paciente afectado fueron iguales. Por lo tanto, solo una de estas secuencias se usó para experimentos adicionales. **B)** Para confirmar estos hallazgos, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR se llevó a cabo con la enzima Mpls, que escinde el alelo natural en la posición de la mutación (flechas en la figura). **C)**. Debido a la presencia de la mutación R304W, se pierde el sitio de restricción Mpls, mostrando al portador heterocigoto una digestión parcial después de la electroforesis en un gel de agarosa al 2%: una banda de 613 pb para el alelo mutante y bandas de 258 y 355 pb para el alelo salvaje. La madre, que tiene ambos alelos salvajes, muestra una digestión completa.

En conclusión, la ausencia congénita de glándulas de Meibomio demostrada por meibografía infrarroja es un hallazgo importante en pacientes con síndrome EEC y puede causar neovascularización corneal secundaria a alteraciones crónicas debidas al ojo seco evaporativo severo, contribuyendo aún más a la enfermedad de la superficie ocular en este grupo de pacientes. Varias mutaciones en el gen p63 pueden conducir a este fenotipo específico, incluida la mutación R304W.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wessagowitz V, Mellerio JE, Pembroke AC, McGrath JA. Heterozygous germline missense mutation in the p63 gene underlying EEC syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25: 441-3.
2. Rinne T, Hamel B, van Bokhoven H, Brunner HG. Pattern of p63 mutations and their phenotypes—Update. *Am J Med Genet A*. 2006;140:1396–406.
3. Di Iorio E, Kaye SB, Ponzin D, Barbaro V, Ferrari S, Bohm E, et al. Limbal stem cell deficiency and ocular phenotype in ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome caused by p63 mutations. *Ophthalmology*. 2012;119:74–83.
4. Kasmann B, Ruprecht KW. Ocular manifestations in a father and son with EEC syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997;235:512–6.
5. Bonnar E, Logan P, Eustace P. Absent meibomian glands: A marker for EEC syndrome. *Eye (Lond)*. 1996;10 Pt 3:355–61.
6. Garza-León M, Ramos-Betancourt N, Beltrán-Díaz de la Vega F, Hernández-Quintela E. Meibografía. Nueva tecnología para la evaluación de las glándulas de Meibomio. *Rev Mex Oftalmol*. 2017;91:165–71.
7. Garza-León M, de la Parra-Colin P, Beltran-Díaz de la Vega F, Morales-Ochoa H. Manifestaciones clínicas y oftalmológicas en una familia con el síndrome de displasia ectodérmica, ectrodactilia y paladar hendido. *Rev Mex Oftalmol*. 2015;89:172–8.
8. Ota Y, Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Uchino Y, Endo K, et al. Management of evaporative dry eye in ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome. *Optom Vis Sci*. 2008;85:E795–800.
9. Novelli F, Lena AM, Panatta E, Nasser W, Shalom-Feuerstein R, Candi E, et al. Allele-specific silencing of EEC p63 mutant R304W restores p63 transcriptional activity. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2227.