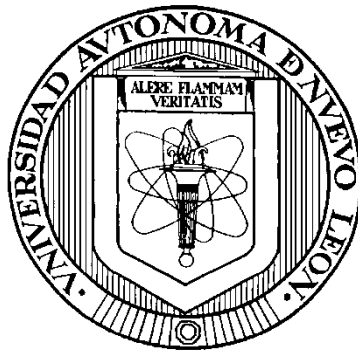


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -1607 2G EN EL PROMOTOR DEL GEN  
*MMP1* Y LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA EPIDERMOLISIS AMPOLLOSA  
DISTRÓFICA RECESIVA EN LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO**

**Por: JORGE GARZA GÓMEZ**

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

**Septiembre, 2014**

**“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -1607 2G EN EL PROMOTOR DEL  
GEN *MMP1* Y LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA EPIDERMOLISIS  
AMPOLLOSA DISTRÓFICA RECESIVA EN LA POBLACIÓN DEL NORESTE  
DE MÉXICO”**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dr. Sc. Hugo Leonid Gallardo Blanco**  
**Director de la tesis**

---

**Dr. Sc. Ricardo M. Cerda Flores**  
**Co Director de la tesis**

---

**Dr. med. Laura Elia Martínez Garza**  
**Miembro Comisión Doctoral**

---

**Dr. Sc. María de los Ángeles Castro Corona**  
**Miembro Comisión Doctoral**

---

**Dr. med. Oliverio Welsh Lozano**  
**Miembro Comisión Doctoral**

---

**Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS**

**A Dios por darme las herramientas para lograr dejar huella en este mundo y darme la sabiduría necesaria para tomar las decisiones correctas.**

**A mis padres por el amor incondicional que me dieron, dan y me seguirán dando,**

**A mi hermana y hermano por ser cómplices y apoyo en mis fracasos y éxitos,**

**A mis amigos por ser compañeros, testigos y cómplices en este barco de vida.**

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo I</b>	<b>Página</b>
1. RESUMEN.....	1
 <b>Capítulo II</b>	
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 Historia .....	5
2.2 Epidemiología, aspectos genéticos y clínicos de las Epidermolisis ampollasas.....	6
2.2.1 Epidermolisis ampollosa simple.....	6
2.2.2 Epidermolisis ampollosa de unión.....	7
2.2.3 Epidermolisis ampollosa distrófica.....	9
2.2.3.1 Fsiopatología.....	9
2.2.3.2 Aspectos clínicos .....	11
2.3 Rol de la metaloproteinasa en la EAD .....	13
2.3.1 Polimorfismo de la porción promotora del gen MMP1.....	14
2.4 La EADR en México.....	15
2.5 Justificación.....	16
 <b>Capítulo III</b>	
3. HIPÓTESIS.....	17
 <b>Capítulo IV</b>	
4. OBJETIVOS.....	18

## Capítulo V

5. MATERIAL Y MÉTODO .....	19
5.1 Población y diseño del muestreo.....	19
5.1.1 Casos.....	19
5.1.2 Controles.....	20
5.1.3 Cálculo de tamaño de la muestra.....	20
5.2 Métodos.....	21
5.2.1 Recolección de datos clínicos.....	21
5.2.2 Extracción de ADN .....	21
5.2.3 Análisis de polimorfismo mediante Electroferesis capilar.....	22
5.2.3.1 Diseño de iniciadores para Análisis de polimorfismo.....	22
5.2.3.1 Reacción en cadena de la Polimerasa.....	23
5.4 Análisis estadístico.....	23
5.5 Recursos materiales.....	24

## Capítulo VI

6. RESULTADOS .....	25
6.1 Controles y polimorfismo de un solo nucleótido del gen <i>MMP1</i> .....	25
6.2 Pacientes con EADr y polimorfismo de un solo Nucleótido del gen <i>MMP1</i> .....	25
6.3 Asociación clínica de los grupos EADr-G y EADr-Sg Con el polimorfismo 2G del gen <i>MMP1</i> .....	25

## Capítulo VII

7. DISCUSIÓN .....	27
--------------------	----

## Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN .....	29
---------------------	----

**Capítulo IX**

9. ANEXOS ..... 30

**Capítulo X**

10. BIBLIOGRAFÍA ..... 33

**Capítulo XI**

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO ..... 37

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Frecuencia alélica del polimorfismo de un solo nucleótido del gen <i>MMP1</i> .....	30
2. Asociación del polimorfismo de un solo nucleótido del gen <i>MMP1</i> con la clínica de los grupos de pacientes con EADr-G y EADr-Sg-.....	31
3. Fenotipos de las EADr, Mutaciones de <i>COL7A1</i> y Polimorfismo del gen <i>MMP1</i> .....	32

## CAPÍTULO I

### RESUMEN

**Antecedentes.** Las epidermólisis ampollosas congénitas son un grupo poco frecuente de enfermedades que se caracterizan por la formación de ampollas en piel y mucosas de manera espontánea o al mínimo traumatismo ocasionadas por alteraciones en genes involucrados en la integridad de la membrana basal (MB). La epidermólisis ampollosa distrófica (EAD) es causada por mutaciones en el gen *COL7A1* encargado de sintetizar al colágeno tipo 7 (C7) que es el componente principal de las fibras de anclaje que están localizadas en la membrana densa y sublamina densa de la MB. La EAD se caracteriza por las cicatrices distróficas y atróficas que dejan sus lesiones, provocando un gran impacto psicológico y socio económico cuando sobreviven después de la infancia. La EAD se hereda de forma dominante (d) o recesiva (r), aunque se han reportado casos *de novo*. La EADd es más benigna y tiende a mejorar con la edad aunque puede ser severa al nacimiento. La EADr presenta los espectros más severos y se clasifica en Severa-generalizada (SG) y Generalizada (G). La EADrSG es la más grave, se manifiesta al nacer con la presencia de grandes ampollas y erosiones en manos y pies, ocasionando pseudosindactilia, con o sin estenosis esofágica y/o criocofaríngea. Las principales causas de muerte son sepsis y carcinoma espinocelular (CAEC) metastático. La EADrG es menos severa, tienen las mismas manifestaciones clínicas que a SG pero en menor grado. Las mutaciones encontradas en las EADr tenemos los codones de terminación prematura, cambios en el marco de



lectura y mutaciones sin sentido. Hasta cierto grado, la severidad clínica se puede correlacionar con el perfil de la mutación en el gen *COL7A1*. Sin embargo, se han reportado casos donde las mutaciones encontradas para el *COL7A1* que pronosticarían una manifestación severa, se presenta de una forma leve. Estos hallazgos sugieren otros factores ambientales y/o genéticos que modifican la severidad en estos pacientes. Antes de la relación directa de las mutaciones en el gen *COL7A1* con la EADr, se pensaba que la metaloproteinasa tipo 1 (*MMP-1*), con propiedades líticas en la matriz extracelular, era la principal enzima implicada en su fisiopatología. Existe un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) en la posición-1607 del promotor del gen caracterizado por la inserción de una guanina (2G), el cual propicia mayor síntesis y como consecuencia, mayor lisis de la matriz extracelular. Estudios internacionales reportan que la frecuencia del SNP 2G es de un 30% en la población general, sin embargo en México se desconoce su frecuencia. Estudios previos han sugerido la asociación del polimorfismo con mayor severidad de la EADrSG, ya que al haber más producción de MMP-1 se generaría mayor cicatriz distrófica y atrófica.

**Objetivo.** Definir la correlación del SNP 2G con las manifestaciones clínicas de la EADr en pacientes del Noreste de México.

**Justificación.** A la fecha no existe un estudio en México que evalúe la asociación del SNP 2G con la clínica de pacientes con EADr, este estudio puede orientar a nuevas opciones terapéuticas, tópicas o sistémicas, enfocadas en la inhibición de la sobreproducción de la MMP-1 y así prevenir o reducir en lo

posible la cicatrización atrófica que conlleva por sus complicaciones a una elevada mortalidad y una muy deteriorada calidad de vida.

**Métodos:** Se incluyeron 30 pacientes del Noreste de México con EADr. La clasificación clínica se realizó de acuerdo al Tercer consenso para el diagnóstico y clasificación de las epidermólisis ampollosas, donde se identificaron 14 pacientes con EADrG y 16 pacientes con EADrSG. Se tomaron muestras de 150 controles cuyos cuatro abuelos provinieran del Noreste de México, teniendo una relación de 5:1 con los pacientes. La identificación del polimorfismo rs1799750 se realizó secuenciación directa de la porción promotora del gen *MMP1*.

**Análisis estadístico:** Para establecer la asociación del polimorfismo rs1799750 con la evaluación de la severidad para epidermólisis ampollosa se utilizaron los siguientes paquetes computacionales: 1. MAXLIK para valorar el polimorfismo y su frecuencia alélica, 2. RXC con 50,000 simulaciones para comparar los perfiles genotípicos y alelicos de casos y controles y 3. Paquete EPISODE para el análisis de asociación (positiva o negativa) y por ende la razón de momios (OR).

**Resultados:** Las frecuencias alélicas para el polimorfismo 2G fueron 0.607, 0.562, y 0.642 para los pacientes con EADrG, EADrSG y Grupo control respectivamente. Cuando los genotipos fueron comparados, no existió diferencia significativa entre los EADrSG (OR = 0.38, CI<sup>95%</sup> 0.12 – 1.21), EADrG (OR = 1.03, CI<sup>95%</sup> 0.21 – 4.96), y el grupo control.

**Conclusión:** No encontramos asociación significativa entre la severidad de los sujetos en estudio y el polimorfismo de un solo nucleótido 2G del gen *MMP1*.

## **CAPITULO II**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **HISTORIA**

Las epidermolisis ampollosas congénitas son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la formación de ampollas en piel y mucosas de manera espontánea o al mínimo traumatismo, resultado de la alteración en los diferentes niveles ultraestructurales de la membrana basal.

A la fecha se han demostrado múltiples mutaciones en los genes responsables, permitiendo una mayor comprensión y correlación clínicopatológica de estas genodermatosis que hasta la fecha no tienen tratamiento definitivo.

El término de epidermolisis ampollosa (EA) fue descrito por primera vez en 1886 como una enfermedad ampollosa hereditaria (epidermolisis hereditaria)<sup>1</sup>. Sin embargo, fue hasta 1962 cuando Pearson identificó diferencias moleculares de este grupo de enfermedades mediante microscopia electrónica y dependiendo la afectación a el nivel ultraestructural de la unión dermo-epidérmica las clasifíco en: EA Simple (EAS, separación intraepidérmica), EA de Unión (EAU, separación en la lámina lucida) y EA distrófica (EAD, separación a nivel de la sub-lamina densa de la membrana basal).<sup>2</sup>

Fue en los inicios de la década de los 90 cuando se identificaron en estos pacientes, mutaciones específicas en los genes que codifican proteínas responsables de la unión dermo-epidérmica.<sup>3-6</sup>

En 1988, se realizó el primer consenso para el diagnóstico y clasificación de las EA basándose principalmente en los datos generados por el Registro Nacional de EA en Estados Unidos, obteniendo información epidemiológica, clínica y de estudios de gabinete<sup>7</sup>. En 1999, se realizó un segundo consenso agregándose los nuevos hallazgos genéticos y clínicos, dando énfasis en los subtipos de EA clasificados ultraestructuralmente<sup>8</sup>.

Durante los 8 años posteriores, se aprendió mucho acerca del espectro clínico y moléculas de las EA mediante estudios realizados a miles de pacientes con EA en todo el mundo, detectándose alrededor de 1,000 mutaciones en 10 genes. Con estos datos en el 2007, se llevó a cabo el Tercer consenso internacional para el diagnóstico y la clasificación de las EA, siendo este la última herramienta para la clasificación disponible para el clínico.<sup>9</sup>

## **EPIDEMIOLOGÍA, ASPECTOS GENÉTICOS Y CLINICOS DE LAS EA**

Las EA tienen una baja incidencia, reportándose 50 casos por millón en Estados Unidos, 5.4 casos por millón en Noruega, 9.6 casos por millón en Croacia y hasta 7.8 casos por millón en Japón. De los cuales corresponden a un 92% las EAS, 5% EAD, 1% EAU y el resto se encuentra sin clasificar.<sup>10</sup> En México no existe conocimiento en cuanto su incidencia, pero se han reportado 382 casos por DEBRA, México.

## **EPIDERMOLISIS AMPOLLOSA SIMPLE**

Las EAS son las más benignas, tienen una herencia autosómica dominante, y se manifiestan por mutaciones en genes que codifican a las

queratinas 5 y 14, elementos muy importantes de la membrana basal para la arquitectura de los hemidesmosomas que son encargados de la unión intracelular de los queratinocitos en la epidermis<sup>11,12</sup>. Se manifiesta desde los primeros años de vida hasta la edad adulta y se caracterizan por la formación de ampollas que no dejan cicatrices e inclusive puede ser tan sutil que gran parte de los pacientes no llegan a consultar con el especialista.<sup>13</sup>

Existen dos principales subclasificaciones:

- 1) La EAS Weber-Cockayne que es la más común, generalmente se diagnostica en los primeros años de vida, las lesiones se localizan solo a manos y pies, y a menudo ocurren solo en verano. No hay afección sistémica a excepción de erosiones en la boca.
- 2) La EAS Herpetiforme o Dowling Meara, es la segunda más común, las lesiones se presentan al nacer y se caracterizan por ampollas generalizadas agrupadas en número de 10 a 20 lesiones. Algunos pacientes mueren al nacer por infección, pérdida de líquidos y/o desequilibrio hidroelectrolítico. Pueden presentar contractura de extremidades inferiores, distrofia ungueal y trastornos dentales como pérdida de los mismos e hipoadontia.

## **EPIDERMOLISIS AMPOLLOSA DE UNIÓN**

La EAU, es la menos común y más severa, tiene una herencia autosómica recesiva y es ocasionada por mutaciones en cualquiera de los tres genes encargados de codificar las principales proteínas de la laminina 5, componente

primordial de la lámina lúcida de la membrana basal<sup>14-16</sup>. Tiene dos importantes subclasificaciones:

- 1) *La EAU Herlitz o Letal* que se manifiesta al nacimiento con la formación de ampollas, erosiones, cicatrices y quistes de milia en toda la superficie corporal. Como dato patognomónico presentan una cicatrización con tejido de granulación exuberante, vegetativa o tumoral. En piel cabelluda muestran alopecia cicatrizal. En este fenotipo son muy comunes las lesiones orales severas y a menudo producen microstomía, también en menos porcentaje pueden ocurrir deformidades músculo-esqueléticas, estenosis pilórica, lesiones oculares e inclusive puede ocurrir perforación esofágica pudiendo presentar una infección secundaria, lo cual es una causa importante de muerte especialmente en niño donde la mortalidad es muy alta.
- 2) *La EAU no Herlitz*, también se manifiesta al nacimiento la mayoría no presenta las lesiones alrededor de la cavidad oral y por lo tanto no presentan compromiso en el sistema respiratorio como en la forma Letal. Su cuadro clínico mejora con la edad, sin embargo la lesiones en la piel cabelluda, uñas y dientes con el tiempo se hacen más evidentes. Las membranas mucosas generalmente están afectadas ocasionando fibras de cicatrización, que en el esófago causan estenosis. Existen otros tipos menos comunes como la inversa, que inicia en forma generalizada y posteriormente se localiza solo en sitios de flexión acral la cual es localizada en manos, pies y región pretibial.

## **EPIDERMOLISIS AMPOLLOSA DISTRÓFICA**

La EAD puede haber sido denominada así por las múltiples cicatrices atróficas que estos pacientes desarrollan a lo largo de su vida. Generalmente se diagnostican desde el nacimiento. Su espectro clínico varía desde la presencia de ampollas y úlceras cuya cicatrización atrófica no afecta en la calidad de vida del paciente, hasta casos severos con presencia de grandes ampollas que quedan como cicatrices retractiles que pueden ocasionar pseudosindactilia en manos y pies, teniendo un impacto importante en la calidad de vida. La tendencia a estas cicatrices atróficas se da ya que el nivel de formación de ampolla ocurre debajo de la lámina densa de la membrana basal, permitiendo una cicatrización mesenquimatosa de la dermis. Aparte de la formación de ampollas en piel, también ocurren en el aparato gastrointestinal, particularmente en el esófago provocando estenosis. Los pacientes con EAD pueden presentar erosiones corneales, distrofia y/o pérdida de las uñas y alopecia cicatrizal.<sup>10</sup>

La cicatrización extensa de manos y pies es frecuentemente asociado con el desarrollo de carcinoma espinocelular (CEC) agresivo y rápidamente metastásico, siendo esta una causa importante de mortalidad en estos pacientes.<sup>10,17</sup>

## **FISIOPATOLOGIA DE LA EAD**

La EAD puede ser heredada de forma recesiva (EADr) o dominante (EADd), es causada por mutaciones en el gen *COL7A1*, que codifica la producción del colágeno tipo VII (C7)<sup>18-20</sup> componente principal de las fibras de anclaje en la unión dermo-epidérmica. El *COL7A1* es un gen complejo del



genoma humano que consiste en 118 exones, con un tamaño aproximado de 32kb.<sup>21</sup> Este gen codifica un polipéptido de 350kD con una peculiar organización estructural.<sup>22</sup> La porción central de la molécula consiste en un segmento de colágena conformada por una triple cadena helicoidal. En contraste con la mayoría de los colágenos intersticiales, como los tipos I y III, la triple hélix del C7 esta interrumpida en su porción media por una inserción no colagenosa de 39 aminoácidos. En los extremos de la porción central colagenosa, encontramos un dominio no colagenoso de 145 kD y en el otro extremo otro más pequeño de 20 kD.<sup>22,23</sup>

El C7 es sintetizado principalmente por los queratinocitos que probablemente sean la mayor fuente de esta proteína en la piel humana in vivo, aunque también los fibroblastos dérmicos pueden expresar este gen.<sup>24</sup>

Cuando se excreta el C7 de los queratinocitos, estos forman dímeros antiparalelos con uniones intermoleculares disulfúricas. Posteriormente, un gran número de estos dímeros se unen y forman las fibras de anclaje que van desde la porción inferior de la membrana basal en la unión dermo-epidérmica hasta la porción superior de la dermis papilar, asegurando la unión de la membrana basal epidérmica con la dermis papilar.<sup>25-27</sup>

Varki y colaboradores, analizaron a 322 familias con EAD en donde se identificaron los principales tipos de mutaciones del gen *COL7A1* de los cuales correspondieron a mutaciones sin sentido en un 62.5%, a terminación prematura de codón (PTC, por sus siglas en inglés *premature termination codon*) en un 18% y mutaciones por splicing en un 18%.<sup>6</sup>

## ASPECTOS CLINICOS DE LAS EAD

Clínicamente, las EADd tienen una amplia gama manifestaciones y aunque pueden ser severas al nacimiento, generalmente es leve y tiende a mejorar con la edad.

La EADr presenta los espectros más severos de este tipo de EA<sup>9</sup>, se clasifica en:

- 1) Severa-generalizada (Sg). Es la más grave. Se manifiesta inmediatamente al nacer, por la presencia de grandes ampollas, erosiones en manos, pies, tórax y abdomen. Es común observar quistes de milia, atrofia y cicatrices retráctiles. Afección severa de las porciones distales de las extremidades, provocan contracturas y fusión de dedos y ortijos. Las uñas muestran distrofia y pérdida de las mismas. Las lesiones orales son severas y las caries abundantes. En el ojo se observa queratitis y cicatrices. Las lesiones de la membrana mucosa provocan dificultad para abrir la boca y la afectación mucosa puede ocasionar estenosis esofágica y/o criocofaríngea.

El 55% de los sujetos con este subtipo mueren de CEC metastásico ya que tienen un riesgo acumulativo de 76.5% de desarrollarlo a la edad de 40 años.

- 2) Generalizada (G). Es menos severa, su cuadro clínico es variable, tienen las mismas manifestaciones cónicas que a Severa-generalizada pero en menor grado. La afección puede ser acompañada o no de lesiones en otros sistemas orgánicos. El riesgo acumulativo para desarrollar CEC metastásico es de 27.1% para la edad de los 60 años.

Estas clasificaciones se realizan basándose en el Tercer consenso Internacional para diagnóstico y clasificación de las EA<sup>9</sup> (ANEXO II).

Hasta cierto grado, la severidad clínica se puede correlacionar con el perfil de la mutación en el gen *COL7A1*.<sup>28</sup> La severidad se puede evaluar según la escala de severidad de Birmingham (BEBS, por sus siglas en inglés, Birmingham EB Severity score) que evalúa el área dañada de piel, afectación ungueal, boca, ojos, larínge y esófago, cicatrización de las manos, cáncer de piel, heridas crónicas, alopecia y compromiso nutricional.(ANEXO III)<sup>29</sup>

Desde el descubrimiento de las mutaciones del *COL7A1* como el agente causal de la EADr, se han hecho esfuerzos considerables para la correlación de la presentación clínica con el tipo de mutaciones.<sup>5,30-33</sup>

A pesar de las múltiples observaciones descritas sobre que la mayoría de las EADr-Sg presentan mutaciones heterocigotas compuestas que llevan a PTCs y que los casos menos severos de las EADr-G son ocasionadas por mutaciones sin sentido, solos o en asociación a PTCs, algunos casos quedan fuera de esta relación geno-fenotípica.

En forma particular, se han descrito pacientes con EADr-Sg homocigotos a mutaciones sin sentido<sup>6,18</sup> y pacientes con EADr-G homocigotos para PTCs, sin haber correlación entre la severidad y el tipo de mutación<sup>6,34</sup>. Garza-Gómez y colaboradores realizaron medición de la inmunoreactividad por fluorescencia del C7 en la membrana basal en 13 pacientes mexicanos encontrando diferencia significativa en cuanto a la inmuno reactividad y la presentación clínica.<sup>50</sup> Estos hallazgos sugieren otros factores ambientales y/o genéticos que modifican la severidad en estos pacientes.

## ROL DE LAS METALOPROTEINASA TIPO 1 EN EAD

Antes de la asociación directa con las mutaciones en el gen *COL7A1*, se pensaba que el gen *MMP1*, encargado de codificar la metaloproteinasa tipo 1 (MMP-1), era el principal gen implicado en la fisiopatología de la EADr.<sup>35,36</sup>

La MMP-1 es el miembro más abundante de la familia de las metaloendopeptidasas dependientes de zinc, que tienen función de enzimas líticas para las moléculas de la matriz extracelular como los proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteínas estructurales, como el colágeno y la elastina y proteínas de adhesión, como la fibronectina y la laminina. Esta metaloproteinasa ha sido asociada en diversos procesos que involucran degradación y remodelación tisular como la cicatrización y particularmente la invasión tumoral.<sup>37</sup>

En la piel, la *MMP-1* es secretada por los queratinocitos basales y por los fibroblastos de la dermis y ya que el C7 es uno de sus sustratos<sup>38,39</sup> un aumento en la actividad de *la MMP-1* puede contribuir a una mayor lisis de la matriz extra celular de en las ampollas de los pacientes con EADr generando cicatrices atróficas graves. Esta hipótesis es apoyada por estudios previos que muestran diferencias en la expresión de las metaloproteinasas entre los pacientes con EADr y los controles. Sato y colaboradores, demostraron que la expresión de la MMP-1 y la MMP-3 se encontraba aumentada en los fibroblastos de pacientes con EADr comparado con los controles, siendo la MMP-1 la más específica.<sup>40</sup>

Bodemer y colaboradores, correlacionaron la diferencia en la expresión de la MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 y la severidad de la enfermedad en tres hermanos.<sup>41</sup>

Por lo tanto, aunque el gen *COL7A1* es el causante de la EADr, la producción anormal de la MMP-1 y/o MMP-3 puede tener un papel importante en cuanto a la fisiopatología de la EADr.<sup>40</sup>

### **POLIMORFISMO rs1799750 DEL GEN *MMP1***

Rutter y colaboradores comprobaron que en un 30% de la población existe polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en el área promotora del gen *MMP1*, generando una mayor síntesis de la enzima.<sup>42</sup>

En México, no se conoce la frecuencia del polimorfismo rs1799750. De forma particular el polimorfismo rs1799750, se ha asociado a mayor riesgo de cáncer y su capacidad de invasión metastásica, así como un importante factor en otros trastornos donde la inflamación tiene un papel importante, como la artritis reumatoide, aterosclerosis, entre otros.<sup>43-45</sup>

Tetiux y colaboradores, demostraron asociación de la presencia del polimorfismo rs1799750 con mayor severidad de la EADr en 31 pacientes con EADr, de los cuales 3 de ellos eran homocigotos a una mutación del gen *COL7A1*.<sup>46</sup> Su conclusión era que el polimorfismo rs1799750 desencadena una mayor síntesis de MMP-1 en la fase de cicatrización de las ampollas en pacientes con EADr y como consecuencia puede ocasionar una mayor severidad en las cicatrices atróficas.

Sin embargo Kern y colaboradores sugirieron que no existe una asociación entre el polimorfismo rs1799750 y la severidad clínica en un estudio realizado en 103 pacientes con EADr, concluyendo que existen otros factores genéticos o ambientales que influyan en la presentación clínica de estos pacientes.<sup>47</sup>

## **LA EADr EN MÉXICO**

En nuestro país no existen datos estadísticos en cuanto a la incidencia de la enfermedad, sin embargo gracias a la fundación DEBRA México, A.C. (Dystrophic Epydermolysis Bullosa Research Association A.C), se cuenta con una base de datos de 382 pacientes.

Salas-Alanis y colaboradores detectaron 59 de 67 mutaciones en el gen *COL7A1* en 36 pacientes mexicanos con EADr, de los cuales se encontraron seis mutaciones de tipo codón de terminación prematuro, substitución de glicina, remoción de intrones de novo y depleción interna. La mutación comúnmente más encontrada fue la 2470insG que se encuentra en el exon19 del gen *COL7A1*, en 21 (58.35%) de 36 pacientes, 16 homocigotos.<sup>48,49</sup>

Sin embargo, se encontraron diferencias fenotípicas en pacientes con las mismas mutaciones en el gen *COL7A1*, sugiriendo otros factores genéticos o ambientales que pueden influir en sus manifestaciones clínicas, coincidiendo lo reportado por Garza-Gómez y colaboradores.<sup>50</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

No existen datos que determinen la frecuencia del polimorfismo rs1799750 en México. Será el primer estudio que realizará un análisis de la frecuencia del polimorfismo en la población del Noreste de México.

Gracias a la Fundación DEBRA México, A.C., se cuenta con la base de datos, pacientes y material genético necesario para el estudio.

A la fecha no existe un estudio donde se asocie la severidad de la EADr por medio de una escala y el polimorfismo rs1799750.

Definir el rol del polimorfismo rs1799750 sobre la severidad de la EADr, nos abre el panorama para considerar nuevas opciones terapéuticas, tópicas o sistémicas, que inhiban la sobre producción de la MMP-1 y así prevenir en lo posible la cicatrización atrófica que conlleva por sus complicaciones a una elevada mortalidad y una muy deteriorada calidad de vida.

## **CAPITULO III**

### **HIPOTESIS**

La presencia del polimorfismo rs1799750 en la porción promotora del gen *MMP1* tiene relación con una mayor severidad clínica en pacientes del noreste de México con epidermólisis ampollosa distrófica recesiva



## **CAPITULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación del polimorfismo rs1799750 de la porción promora del gen *MMP1* con el grado de severidad de pacientes mexicanos con epidemolisis ampollosa distrófica recesiva .

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la frecuencia del polimorfismo rs1799750 en el Noreste de México para establecer el grupo control.
2. Obtener mediante caracterización clínica por la escala de Birmingham un grupo de pacientes con EADr en el Noreste de México.
3. Identificar en estos pacientes el polimorfismo rs1799750 en la porción promotora del gen de la metaloproteinasas tipo 1.
4. Establecer el equilibrio de Hardy-Weinberg entre el grupo control y el grupo de pacientes.
5. Definir el grado de severidad del grupo de pacientes con la escala para la severidad de Birmingham.
6. Asociar el puntaje obtenido por la escala para la severidad de Birmingham con la presencia del polimorfismo rs1799750.

## **CAPITULO V**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **POBLACIÓN Y DISEÑO DE MUESTREO**

Se realizó un estudio de caso-control no pareado en población mestiza mexicana, no emparentada y cuyos cuatro abuelos nacieron en algunos de los cinco estados que conforman el Noreste de México: Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila, San Luis Potosí y Zacatecas; de estos se integrarán dos grupos: casos y controles.

Previo a la inclusión se informó al individuo en estudio o tutor el principal propósito del presente estudio, posteriormente firmándose el consentimiento informado.

#### **CASOS**

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

1. Pacientes con Epidermolisis Ampollosa Distrófica Recesiva, mexicanos o extranjeros cuyos padres sean mexicanos, de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí y Zacatecas, que acudan de primera vez o de seguimiento al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de la UANL o a las oficinas centrales de DEBRA México A.C.
2. Varones y mujeres de todas las edades que deseen participar de la investigación. Para menores de 18 años será solicitada la autorización de los padres o tutor legal.

3. Los pacientes deben estar dispuestos a otorgar el consentimiento informado escrito.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

1. Sujetos que no padezcan Epidermolisis Ampollosa Distrófica Recessiva.
2. Pacientes que no sean originarios del Noreste de México
3. Que no acepte participar del protocolo de investigación y no firme el consentimiento informado escrito.
4. Pacientes extranjeros o Mexicanos hijos de padres extranjeros

## **CONTROLES**

Previa firma de consentimiento informado y cumpliendo todos los criterios de inclusión, se tomó sangre periférica de 150 personas que acudieron a realizarse algún estudio al Laboratorio Central del Hospital Universitario “José E. González”, para su posterior aislamiento de DNA.

Se realizó un cuestionario a estas personas para descartar que ellos o algún familiar padezcan Epidermolisis ampullosa distrófica recesiva. (ANEXO V)

## **CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Dado que es una entidad rara, se estudiaron 30 pacientes con EADr, y para darle significancia significativa se tomaron en cuenta 150 controles, dado lo anterior, el número de controles por caso fue de una proporción 5:1, de acuerdo a lo propuesto por Coggon y colaboradores<sup>51</sup> para estudios de asociación de enfermedad con polimorfismos.

## **MÉTODOS.**

### **RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS**

La carpeta de cada paciente consta de: ficha de identificación (datos socio-demográficos), evaluaciones clinicométricas y hoja de consentimiento informado.

La evaluación inicial en pacientes se realizó por el tesista realizando una exploración e historia médica completa. En todos los pacientes se corroboró el diagnóstico de EADr a través de los criterios del Tercer consenso internacional para el diagnóstico y clasificación de las epidermólisis ampollosas y la severidad por la escala de Birmingham evaluando el área dañada de piel, afectación ungueal, boca, ojos, larínge y esófago, cicatrización de las manos, cáncer de piel, heridas crónicas, alopecia y compromiso nutricional.

### **BANCO DE MUESTRAS.**

Se tomaron muestras de sangre en EDTA para extracción de ADN y de suero en tubos secos para futuros estudios de proteómica. Estas colecciones se mantienen en un registro confidencial con los datos de cada sujeto. El procesamiento de la muestra de sangre se realizó en el departamento de genética de la Facultad de Medicina de la UANL. Las muestras sanguíneas se almacenaron a temperatura ambiente.

### **EXTRACCION DE ADN**

1. Se tomó una muestra de 0.5 ml de sangre no coagulada, en tubos con EDTA con técnica de Vacutainer.

2. Separación de los glóbulos blancos: se añade 20ml de agua destilada fría a 5ml de sangre y mezclar. Enseguida se incuba en hielo por 15 min y se centrifuga a 2,500 rpm por 20 min.
3. Lisis de glóbulos blancos: suspender en 25 ml de Solución I (triton lisis buffer), se incuba en hielo por 10 a 15 min y se centrifuga por 15-20 min.
4. Digestión: se resuspende en 5ml de solución II (pk Buffer), y añadir 125 microlitros SBA 10% y 50 microlitros de proteinasa K (10mg/ml pk) e incubar por 2 a 3 horas a 55 C y añadir 2ml de NaCl 6M y mezclar y centrifugar.
5. Precipitación con alcohol: Posteriormente se coloca el sobrenadante en un tubo nuevo y se le añade un volumen igual de isopropanolol y se mezcla por inversión.
6. Lavado de DNA: Se centrifuga por 10 min y se resuspende en 1 ml de etanol al 90% y se transfiere a un tubo eppendorf y se lava dos veces con etano, al 70% y se centrifuga por 2-4 min, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en agua.

## **ANÁLISIS DE POLIMORFISMO POR SECUENCIACIÓN DIRECTA**

### **DISEÑO DE INICIADORES PARA ANÁLISIS DE SNPS**

Los iniciadores fueron diseñados con el paquete computacional Primer Design 3. Las secuencias de los iniciadores usados para amplificar y detectar la región promotora del gen *MMP1* fueron 5'- GCACCCTCCCTCTGATGCCTCT -

3' and 5'- GGTGTCTCCCAGCTTTCCCCTGT -3', el producto amplificado es de 280 pares de bases.

## **PCR**

Inicialmente se estandarizó la reacción de amplificación por PCR para los oligonucleótidos requeridos para caracterizar el SNP del gen *MMP1* para trasladarlo a un sistema PCR múltiplex, en el cual se optimizaron las condiciones, por medio de un análisis factorial de 2 niveles, con variables continuas y discontinuas. La genotipificación del SNP se realizó por secuenciación directa mediante el secuenciador 3100-Avant Genetic Analyzer, se analizará 1.5 µl de producto de la PCR con 10 µl de formamida y 0.3 µl de GS500, desnaturalizados a 95°C por 10 min y 10 min a -20°C.

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Para establecer la asociación del polimorfismo rs1799750 con la evaluación de la severidad para epidermólisis ampollosa de Birmingham se utilizaron los siguientes paquetes de análisis: 1. MAXLIK para valorar el polimorfismo y su frecuencia alélica, 2 RXC con 50,000 simulaciones para comparar los perfiles genotípicos y alélicos de casos y controles y 3. en caso de encontrar diferencias significativas en el punto anterior, se utilizara el análisis de asociación (positiva o negativa) y por ende la razón de momios (OR) mediante el uso del paquete EPISODE.

## **RECURSOS MATERIALES:**

Este estudio se realizó en 3 sitios:

- La valoración y extracción de sangre periférica del paciente en las oficinas centrales de la Fundación DEBRA México, A.C y en el servicio de Dermatología y
- Identificación del polimorfismo rs1799750 por electroforesis capilar y análisis estadístico en el Servicio de Genética del Hospital Universitario de la UANL.

## **RECURSOS FINANCIEROS: PROPIOS**

## CAPITULO VI

### RESULTADOS

#### **Controles y polimorfismo de un solo nucleótido del gen *MMP1*.**

En orden de frecuencia los genotipos 1G/1G, 1G/2G y 2G/2G (12.6%, 41.4% y 46%) estuvieron presentes en el grupo control del estudio. La distribución de los genotipos se puede apreciar en la TABLA 1.

El alelo con mayor frecuencia fue el 2G (64.2%), similar a la reportado en la base de datos de NCBI SNP en otro grupo control de población hispana (63%). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs1799750>).

#### **Pacientes con EADr y polimorfismo de un solo nucleótido del gen *MMP1*.**

El polimorfismo 2G del gen *MMP1* fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en pacientes como en controles. El alelo con mayor presencia en nuestro grupo de pacientes fue el 2G (58.4%) mostrando menos frecuencia comparada con los controles, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Las frecuencias alélicas para 2G fueron respectivamente para EADr-G y EADr-Sg, 60.7% y 56.2%. TABLA 1.

#### **Asociación clínica de los grupos EADr-G y EADr-Sg con el polimorfismo 2G del gen *MMP1***

Al compararse las frecuencias de los genotipos no se encontró diferencia significativa entre el grupo de pacientes EADr-Sg (OR = 0.38, CI<sup>95%</sup> 0.12 –



1.21), EADr-G (OR = 1.03, CI<sup>95%</sup> 0.21 – 4.96) y el grupo control como se muestra en la TABLA 2.

## CAPITULO VII

### DISCUSIÓN

La regulación del gen *MMP1* depende directamente de la producción endógena de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (ITMPs). Este sistema homeostático ocurre en el proceso normal de la cicatrización de una herida, y como en los pacientes con EADr la piel se encuentra en constante reparación puede llevar a problemas en el balance de la MMP-1 y sus inhibidores.

El polimorfismo 2G del gen *MMP1* tiene una actividad elevada de transcripción en la expresión de *MMP-1* aumentando su función de colagenasa y por lo tanto ha sido asociado a una mayor invasión por cáncer, artritis y otras enfermedades donde el colágeno está involucrado.

Se ha propuesto que esta variable genética que aumenta la expresión de MMP-1, puede tener un papel modulador en la severidad de la enfermedad en paciente con EADr y poder definir valores pronósticos de importancia así como el diseño de terapias celulares que puedan usarse en pacientes con EADr<sup>46</sup>.

Kern y colaboradores, sugirieron que dado el número pequeño de pacientes con EADr disponibles en el mundo, es esencial el estudio de este polimorfismo en la severidad clínica de los pacientes de diferentes grupos poblacionales<sup>47</sup>.

Al igual que Salas y colaboradores<sup>48</sup>, nosotros encontramos que la mutación 2470insG del gen *COL7A1* localizado en el exón 18/19 es el de más prevalencia en nuestro grupo de pacientes. Es de esperarse que el fenotipo en estos pacientes tengan un genotipo homogéneo, pero como se puede observar

en la TABLA 3 no todos los pacientes con la mutación  $\Delta$ x 18/19, 2470insG del gen *COL7A1* tienen las mismas características físicas. Sin embargo, no se encontró relación entre el polimorfismo 2G del gen *MMP1* con el genotipo de los pacientes, con esto podemos asumir que existen otros factores modificadores de la enfermedad involucrados.

En nuestro estudio analizamos 130 individuos controles cuyos cuatro abuelos provinieran específicamente del Noreste de México y fueron comparados con 30 pacientes del mismo antecedente geográfico.

La frecuencia alélica del polimorfismo 2G en la población hispánica es diferente a la encontrada en la población caucásica donde el alelo más frecuente es el 1G (56.7%) al contrario de la población hispánica donde el alelo 2G es el más frecuente (63%).

Esta mayor frecuencia alélica del polimorfismo 2G podría sugerir una mayor severidad clínica en pacientes con EADr, sin embargo independientemente del tipo de mutación del gen *COL7A1*, los pacientes con menor severidad mostraron mayor frecuencia del polimorfismo comparado con los pacientes EADrSg.

No encontramos diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con EADrSg. Consideramos que es importante aumentar el tamaño de muestra y estudiar el polimorfismo en otros grupos poblacionales para determinar, en caso de que exista, la contribución del polimorfismo en la porción promotora del gen *MMP1* en la EADr.

## **CAPITULO VIII**

### **CONCLUSIÓN**

No encontramos diferencia significativa entre la severidad clínica de pacientes con EADr y el polimorfismo 2G de la porción promotora del gen *MMP1* en nuestra cohorte del Noreste de México. Dada la baja incidencia de esta enfermedad, se necesitan realizar estudios en otros grupos poblacionales para valorar el impacto real del polimorfismo 2G en la severidad clínica de los pacientes. La principal limitación de nuestro estudio fue que los controles no fueron pareados con cada uno de los casos de los grupos de pacientes, sin embargo la proporción de controles-pacientes fue de 3:1 para poder dar un suficiente peso estadístico al estudio.

Realizar futuros análisis del balance entre las proteasas y sus inhibidores, podrían esclarecer el rol de las MMPs y la EA, y ayudar a encontrar nuevas alternativas terapéuticas que puedan aumentar la calidad de vida en los pacientes con EADr.

## CAPITULO IX

### ANEXOS

**TABLA 1.** Frecuencia alélica del polimorfismo de un solo nucleótido del gen *MMP1*.

Genotipo	Controles	EADr-G	EADr-Sg	HISPANIC <sup>a</sup>
1G/1G	19 (12.6%)	2 (14.3%)	5 (31.2%)	17.4%
1G/2G	55 (41.4%)	7 (50.0%)	4 (25.0%)	39.1%
2G/2G	56 (46.0%)	5 (35.7%)	7 (43.8%)	43.5%
N° total de pacientes	130	14	16	23
1G frecuencia alélica	0.3577	0.3929	0.4375	0.370
2G frecuencia alélica	0.6423	0.6071	0.5625	0.630

EADr-G, epidermólisis ampollosa distrófica recesiva otras Generalizadas, EADr-Sg, epidermólisis ampollosa severa generalizada. <sup>a</sup>Veintitrés individuos de descendencia hispana.

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1799750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799750)).

**TABLA 2.** Asociación del polimorfismo de un solo nucleótido del gen *MMP1* con la clínica de los grupos de pacientes con EADr-G y EADr-Sg-.

	$\chi^2$	OR	CI <sup>95%</sup>	Valor P
Controles vs EADr-G	0.00	1.03	[0.21 – 4.96]	0.97
Controles vs EADr-Sg	2.87	0.38	[0.12 – 1.21]	0.09

**TABLA 3.** Fenotipos de las EADr, Mutaciones de COL7A1 y Polimorfismo del gen

*MMP1*

Código	Edad	MUT1	MUT2	Fenotipo Esperado	Fenotipo Actual	Puntuación BEBS	MMP1 SNP
GEP1062	38	'x 56, G1703E	'x 69, 5772insT	O	O	15.6	2G/2G
GEP1061	52	'x 18/19, 2471insG	'x 56, G1703E	O	SG	23.5	2G/2G
GEP1095	35	'x 56, G1703E	'x 69, 5772insT	O	O	24.1	2G/2G
GEP1057	32	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	SG	23.4	2G/2G
GEP1074	37	'x 56, G1703E	ivs23-1G>A	O	SG	20.5	2G/2G
GEP1060	42	'x 56, G1703E	ivs23-1G>A	O	SG	20.75	2G/2G
GEP1072	19	'x 73, 6026 G>C; G2009A	N/A	O	SG	20.75	2G/G
GEP1133	42	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	O	26.75	2G/G
GEP1076	32	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	O	27	2G/G
G0847 <sup>+</sup>	62	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	O	29.5	2G/G
GEP1055	29	'x 56, G1703E	'x 84, c.6696insC	O	O	15.5	2G/G
GEP1068	36	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	O	8.75	G/G
GEP1066	35	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	O	15.5	G/G
GEP577	27	'x 18/19, 2471insG	'x 32, 3948insT	SG	SG	19.5	G/G
GEP1067	37	'x 18/19, 2471insG	'x 18/19, 2471insG	SG	SG	20	G/G
GEP1065	16	'x79 6501G>A	N/A	O	SG	30	G/G
GEP1073	16	N/A	N/A	N/A	SG	59.75	G/G
GEP1048	5	NA	NA	N/A	O	12	2G/2G
GEP1064	11	N/A	N/A	N/A	SG	19.6	2G/2G
GEP1069	9	N/A	N/A	N/A	O	20.75	2G/2G
GEP1075	16	N/A	N/A	N/A	SG	29	2G/2G
GEP1093	16	N/A	N/A	N/A	SG	31	2G/2G
GEP1053	25	N/A	N/A	N/A	O	15.5	2G/2G
GEP1058	6	N/A	N/A	N/A	O	6.7	2G/G
GEP1056 <sup>+</sup>	10	NA	NA	N/A	SG	15	2G/G
GEP1059	16	N/A	N/A	N/A	SG	23.4	2G/G
GEP946	39	N/A	N/A	N/A	SG	34.5	2G/G
GEP1047	5	N/A	N/A	N/A	O	15.5	2G/G
GEP1049 <sup>+</sup>	19	N/A	N/A	N/A	O	6.7	2G/G
GEP1071	6	N/A	N/A	N/A	SG	18.5	G/G

EADr-G, epidermólisis ampullosa distrófica recesiva otras Generalizadas, EADr-Sg, epidermólisis ampullosa severa generalizada, BEBS, The Birmingham Epidermolysis Bullosa Severity score; <sup>+</sup> Finados durante el estudio..

## CAPITULO X

### BIBLIOGRAFIA

1. H. K. Hereditare anlage zur blasenbildung (epidermolysis hereditaria). Volume 12: Dtsch Med Wochenschr, 1886:21-2.
2. PEARSON R. Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol. 1962 Dec; 39:551-75.
3. Aumailley M, Has C, Tunggal L, Bruckner-Tuderman L. Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. Expert Rev Mol Med. 2006;8(24):1-21.
4. Smith F, Eady R, Leigh I, et al. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. Nat Genet. 1996 Aug;13(4):450-7.
5. Varki R, Sadowski S, Pfindner E, Uitto J. Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. J Med Genet. 2006 Aug;43(8):641-52.
6. Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfindner E. Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. J Med Genet. 2007 Mar;44(3):181-92.
7. Fine J, Bauer E, Briggaman R, et al. Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. J Am Acad Dermatol. 1991 Jan;24(1):119-35.
8. Fine J, Eady R, Bauer E, et al. Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. J Am Acad Dermatol. 2000 Jun;42(6):1051-66.
9. Fine J, Eady R, Bauer E, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. J Am Acad Dermatol. 2008 Jun;58(6):931-50.
10. Fine J-D, National Epidermolysis Bullosa Registry (U.S.). Epidermolysis bullosa : clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1999. xviii, 490 p. p.
11. Stephens K, Ehrlich P, Weaver M, Le R, Spencer A, Sybert V. Primers for exon-specific amplification of the KRT5 gene: identification of novel and recurrent mutations in epidermolysis bullosa simplex patients. J Invest Dermatol. 1997 Mar;108(3):349-53.
12. Schuilenga-Hut P, Vlies P, Jonkman M, Waanders E, Buys C, Scheffer H. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. Hum Mutat. 2003 Apr;21(4):447.



13. Horn H, Priestley G, Eady R, Tidman M. The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. *Br J Dermatol.* 1997 Apr;136(4):560-4.
14. Ryan M, Tizard R, VanDevanter D, Carter W. Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. *J Biol Chem.* 1994 Sep;269(36):22779-87.
15. Pulkkinen L, Jonkman M, McGrath J, Kuijpers A, Paller A, Uitto J. LAMB3 mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa: consequences at the mRNA and protein levels. *Lab Invest.* 1998 Jul;78(7):859-67.
16. Pulkkinen L, Gerecke D, Christiano A, Wagman D, Burgeson R, Uitto J. Cloning of the beta 3 chain gene (LAMB3) of human laminin 5, a candidate gene in junctional epidermolysis bullosa. *Genomics.* 1995 Jan;25(1):192-8.
17. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Li KP, Suchindran C. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: The National EB Registry experience, 1986-2006. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Nov 19.
18. Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, et al. Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep;61(3):599-610.
19. Sakai L, Keene D, Morris N, Burgeson R. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986 Oct;103(4):1577-86.
20. Uitto J, Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification. *Clin Dermatol.* 23(1):33-40.
21. Christiano A, Hoffman G, Chung-Honet L, et al. Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics.* 1994 May;21(1):169-79.
22. Christiano A, Greenspan D, Lee S, Uitto J. Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *J Biol Chem.* 1994 Aug;269(32):20256-62.
23. Christiano A, Rosenbaum L, Chung-Honet L, et al. The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willebrand factor. *Hum Mol Genet.* 1992 Oct;1(7):475-81.
24. Ryyänen J, Sollberg S, Olsen D, Uitto J. Transforming growth factor-beta up-regulates type VII collagen gene expression in normal and transformed epidermal keratinocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Oct;180(2):673-80.
25. Brittingham R, Uitto J, Fertala A. High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May;343(3):692-9.

26. Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, et al. Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Lab Invest.* 1997 Jun;76(6):753-63.
27. Chen M, Marinkovich M, Veis A, et al. Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin. *J Biol Chem.* 1997 Jun;272(23):14516-22.
28. Järvikallio A, Pulkkinen L, Uitto J. Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene (COL7A1). *Hum Mutat.* 1997;10(5):338-47.
29. Moss C. The Birmingham Epidermolysis Bullosa Severity score: development and validation. In: Wong A (ed). Volume 160. *British Journal of Dermatology*, 2009:1057 - 65.
30. Gardella R, Zoppi N, Zambruno G, Barlati S, Colombi M. Different phenotypes in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients sharing the same mutation in compound heterozygosity with two novel mutations in the type VII collagen gene. *Br J Dermatol.* 2002 Sep;147(3):450-7.
31. Wessagowit V, Kim S, Woong Oh S, McGrath J. Genotype-phenotype correlation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: when missense doesn't make sense. *J Invest Dermatol.* 2005 Apr;124(4):863-6.
32. Kern J, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C. Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2006 May;126(5):1006-12.
33. Shimizu H, McGrath J, Christiano A, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. *J Invest Dermatol.* 1996 Jan;106(1):119-24.
34. Yonei N, Ohtani T, Furukawa F. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa: case of non-Hallopeau-Siemens variant with premature termination codons in both alleles. *J Dermatol.* 2006 Nov;33(11):802-5.
35. Bauer E, Eisen A. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Evidence for increased collagenase as a genetic characteristic in cell culture. *J Exp Med.* 1978 Nov;148(5):1378-87.
36. Stricklin G, Welgus H, Bauer E. Human skin collagenase in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Purification of a mutant enzyme from fibroblast cultures. *J Clin Invest.* 1982 Jun;69(6):1373-83.
37. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003 Nov;253(1-2):269-85.
38. Ala-aho R, Kähäri V. Collagenases in cancer. *Biochimie.*87(3-4):273-86.
39. Seltzer J, Eisen A, Bauer E, Morris N, Glanville R, Burgeson R. Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin. *J Biol Chem.* 1989 Mar;264(7):3822-6.

40. Sato T, Nomura K, Hashimoto I. Expression of collagenase and stromelysin in skin fibroblasts from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol Res*. 1995;287(5):428-33.
41. Bodemer C, Tchen S, Ghomrasseni S, et al. Skin expression of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in sibling patients with recessive dystrophic epidermolysis and intrafamilial phenotypic variation. *J Invest Dermatol*. 2003 Aug;121(2):273-9.
42. Rutter J, Mitchell T, Buttice G, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998 Dec;58(23):5321-5.
43. Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res*. 1999 Sep;59(17):4225-7.
44. Ghilardi G, Biondi M, Mangoni J, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res*. 2001 Aug;7(8):2344-6.
45. Ye S, Dhillon S, Turner S, et al. Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. *Cancer Res*. 2001 Feb;61(4):1296-8.
46. Titeux M, Pendaries V, Tonasso L, Décha A, Bodemer C, Hovnanian A. A frequent functional SNP in the MMP1 promoter is associated with higher disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat*. 2008 Feb;29(2):267-76.
47. Kern J, Grüninger G, Imsak R, et al. Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. *Br J Dermatol*. 2009 Nov;161(5):1089-97.
48. César Salas-Alanis J, McGrath J. [2470insG, represents the commonest mutation in Mexican patients with dystrophic bullous epidermolysis. A study of 21 families]. *Gac Med Mex*. 142(1):29-34.
49. Salas-Alanis J, Amaya-Guerra M, McGrath J. The molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa in Mexico. *Int J Dermatol*. 2000 Jun;39(6):436-42.
50. Garza-Gómez J. Level of type vii collagen at the basement membrane does not always correlate with clinical severity in a cohort of 13 Mexican patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Annual Meeting of the Society of Investigative Dermatology. Montreal, Canada: *Journal of Investigative Dermatology*;129: S1-S145
51. Coggon D, Rose G. *Epidemiology for the uninitiated*. 4th ed. London, UK: British Medical Journal Publishing Group; 1997.

## **CAPITULO XI**

### **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

Nacido el 12 de Julio de 1980, primogénito de Jorge Garza Martínez y Minerva Gómez Flores, hermano de Minerva Garza Gómez y David Eugenio Garza Gómez. Curse la carrera de medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León generación 1998-2004 graduado con Honores. Realicé la especialidad en Dermatología en la misma Universidad generación 2007-2011.

Durante mi entrenamiento como médico y dermatólogo, tuve la oportunidad de rotar en diversos centros de investigación realizando apoyo y trabajo propio en biología molecular de los cuales sobresale la Escuela de Salud Pública de Harvard, Ninewells Hospital en la Universidad de Dundee en Escocia, Universidad de Londres y la Universidad de Texas en el Centro médico SouthWestern.

Mis áreas de interés son la dermatología, genética y programas de bienestar al trabajador.

Actualmente ejerzo la Dermatología en forma privada.