

11216  
5



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
División de Estudios de Posgrado  
e Investigación  
Secretaría de Salud  
Instituto Nacional de Pediatría

## FRECUENCIA DE LA MUTACION PRO250ARG EN EL GEN FGFR3 EN PACIENTES CON CRANEOSINOSTOSIS CORONAL AISLADA.

Trabajo de Investigación que presenta  
**DRA. ASTRID RASMUSSEN ALMARAZ**  
para obtener el diploma de especialista en:  
**GENETICA MEDICA**

TUTORES DE TESIS:  
DRA. ARIADNA GONZALEZ DEL ANGEL  
DRA. LORENA OROZCO OROZCO



México, D.F.

2000

278393



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

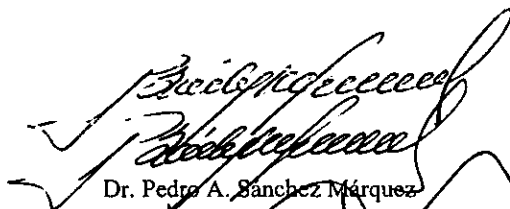
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

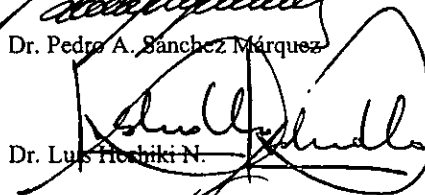
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**FRECUENCIA DE LA MUTACION PRO250ARG EN EL GEN FGFR3 EN  
PACIENTES CON CRANEOSINOSTOSIS CORONAL AISLADA.**

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

  
Dr. Pedro A. Sanchez Márquez

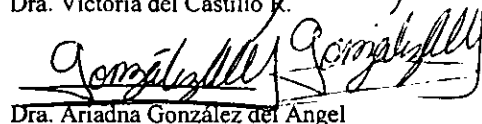
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE  
ENSEÑANZA DE PRE Y POSGRADO

  
Dr. Luis Hoshiki N.

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

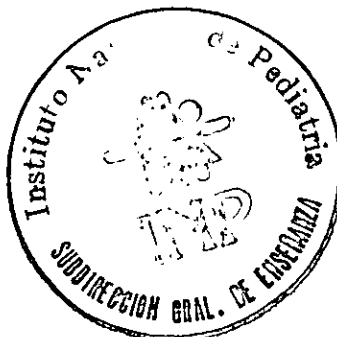
  
Dra. Victoria del Castillo R.

TUTORA DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

  
Dra. Ariadna González del Angel

TUTORA DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

  
Dra. Lorena Orozco Orozco



# FRECUENCIA DE LA MUTACION PRO250ARG EN EL GEN FGFR3 EN PACIENTES CON CRANEOSINOSTOSIS CORONAL AISLADA.

## INDICE

I.	Resumen	5
II.	Introducción	
	1. Aspectos clínicos de las craneosinostosis	7
	2. Aspectos moleculares de las craneosinostosis	8
	3. Aspectos moleculares del gen FGFR3	9
	4. Mutaciones en FGFR3	10
III.	Justificación	11
IV.	Objetivos	
	1. General	12
	2. Específicos	12
V.	Hipótesis	12
VI.	Clasificación de la investigación	12
VII.	Material y Métodos	
	1. Criterios de inclusión	12
	2. Criterios de exclusión	13
	3. Población de estudio	13
	4. Creación de un banco de DNA	13
	5. Cuantificación del DNA	14
	6. Integridad del DNA	14
	7. Identificación de la mutación Pro250Arg	

a)	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa	14
b)	Restricción con NciI del producto amplificado	15
VIII.	Resultados	
1.	Análisis clínico	16
2.	Estudio molecular	17
3.	Cuadro clínico del paciente 11 (Pro250Arg/N)	17
IX.	Discusión	19
X.	Bibliografía	23
XI.	Figuras	26
XII.	Tablas	38

## **FRECUENCIA DE LA MUTACION PRO250ARG EN EL GEN FGFR3 EN PACIENTES CON CRANEOSINOSTOSIS CORONAL AISLADA.**

### **RESUMEN**

La craneosinostosis coronal aislada se debe al cierre prematuro de la sutura coronal, clínicamente los casos esporádicos son indistinguibles de los casos familiares, por lo que el asesoramiento genético generalmente se otorga con base en el riesgo empírico. Recientemente se ha descrito la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 en algunos pacientes con craneosinostosis coronal, en el estudio familiar se han identificado individuos portadores de la mutación con expresividad variable o incluso no penetrancia. En estos casos el asesoramiento genético se modifica de manera importante, ya que los individuos con la mutación Pro250Arg tienen un riesgo del 50% de transmitirla a su descendencia.

El presente estudio tuvo por objeto conocer si la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 se presentaba en algunos individuos con craneosinostosis coronal no sindrómica que acuden al Instituto Nacional de Pediatría (INP), así como identificar los casos de no penetrancia o expresividad variable en los familiares de primer grado para brindar un asesoramiento genético certero. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (INP) en el lapso comprendido entre Enero y Diciembre de 1999, con un diseño clínico, observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

Se incluyeron 16 pacientes y sus familiares de primer grado. En cada caso, se realizó una historia clínica con árbol genealógico así como radiografías y tomografía axial computada de cráneo con reconstrucción tridimensional que comprobaron la sinostosis. A los familiares de primer grado se les realizó un estudio clínico y radiológico. Para el estudio molecular se tomó una muestra de 10 ml. de sangre venosa a partir de la cual se creó un banco de DNA. Se amplificó el exón 7 del gen FGFR3, con una secuencia intrónica adyacente, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El fragmento amplificado fue restringido con la enzima NciI y los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa con el fin de determinar si presentaban o no la mutación Pro250Arg.

De los 16 casos índice estudiados, uno presentó la mutación Pro250Arg en estado heterocigoto, el paciente tenía craneosinostosis coronal bilateral así como dismorfias menores

faciales y algunas alteraciones menores en extremidades. En el análisis familiar se identificó la mutación Pro250Arg en el padre del paciente quien antes del estudio molecular se había diagnosticado como clínicamente sano. El estudio radiológico descartó afección de suturas craneales en el padre, pero en una exploración física intencionada se observó un cráneo con tendencia a la braquicefalia, fisuras palpebrales hacia abajo y las órbitas poco marcadas. Estos últimos datos permitieron establecer que en esta familia existía expresividad variable y se brindó un asesoramiento genético de certeza con una forma de herencia autosómica dominante.

La frecuencia de la mutación Pro250Arg en la población analizada fue de 6.25%, la cual parece menor a la descrita en la literatura, sin embargo los resultados del presente estudio enfatizan la importancia de definir con precisión las características fenotípicas asociadas con la mutación Pro250Arg del gen FGFR3, así como la necesidad de ofrecer el diagnóstico molecular a los individuos con craneosinostosis coronal no sindrómica familiar o esporádica, con el fin de contar con un diagnóstico de certeza que permita brindar un asesoramiento genético preciso.

## INTRODUCCION

### 1. ASPECTOS CLINICOS DE LAS CRANEOSINOSTOSIS

Al nacimiento los huesos que forman la bóveda del cráneo en el humano se encuentran separados entre sí por surcos angostos de tejido conectivo denominados suturas. En los sitios donde se unen más de dos huesos, las suturas se ensanchan y se llaman fontanelas (Langman J., 1976).

La craneosinostosis se define como el cierre prematuro de una o más suturas craneales, lo cual condiciona una deformidad craneal que dependerá de la o las suturas involucradas y la etapa de desarrollo en la cual ocurre la fusión. (Rimoin y cols., 1997). Así, cuando la sutura coronal está involucrada, el cráneo será braquicéfalo (disminución del diámetro antero-posterior); cuando la sutura sagital está afectada se presenta la escafocefalia, (diámetro biparietal disminuido); mientras que si la sutura coronal o lambdoidea es la implicada el cráneo es asimétrico o plagiocefálico y por último el cierre prematuro de la sutura metópica condiciona que el hueso frontal tenga una prominencia que determina una forma triangular de cráneo denominada trigonocefalia. Cuando la sinostosis es múltiple se presentan formas más complejas de deformidad craneal.

La craneosinostosis de acuerdo a su etiología puede ser primaria, cuando la causa de la fusión ósea es intrínseca a la sutura, o secundaria cuando existe otra patología de base como defectos en el sistema nervioso central, constricción fetal in útero, alteraciones metabólicas tales como hipertiroidismo, hipercalcemia o hipofosfatasa, o exposición prenatal a diversos fármacos como la aminopterina, difenilhidantoína, ácido retinoico, ácido valproico y oximetazolina. (Cohen, M.,1991).

La craneosinostosis también puede dividirse en aislada, cuando es la única malformación presente en el paciente, o sindrómica cuando se asocia a otras malformaciones. Se conocen más de 90 síndromes que pueden cursar con craneosinostosis, de estos, los mas representativos son el síndrome de Crouzon, Apert, Pfeiffer, Jackson-Weiss, Saethre-Chotzen y Carpenter. En términos generales, estos padecimientos se asocian a otras alteraciones craneofaciales y de extremidades las cuales en la mayoría de los casos permiten establecer el diagnóstico diferencial. (Rimoin y cols., 1997; Stevenson y cols., 1993).



La frecuencia de las craneosinostosis oscila de 0.4 a 1 por 1000 habitantes, siendo más frecuente la aislada que la sindrómica. De las aisladas, la sinostosis sagital es la más común, ya que representa el 56-58% de los casos, la sinostosis coronal constituye del 18 al 29% de los casos, con un ligero predominio de pacientes femeninos, mientras que el cierre prematuro de la metópica contribuye al 6% de los casos, otras sinostosis o sinostosis múltiples representan hasta un 20% (Rimoin y cols.,1997; Cohen, 1991).

En la craneosinostosis aislada, la mayoría de los casos son esporádicos sin recurrencia familiar pero aproximadamente el 2% de las sinostosis sagitales y el 8% de las sinostosis coronales son familiares. El patrón de herencia es autosómico dominante con expresividad variable (la severidad del fenotipo varía entre individuos afectados incluso dentro de una misma familia) y una penetrancia incompleta (individuos que clínica y radiológicamente son sanos pero que pueden transmitir el padecimiento a su descendencia: no penetrancia).

## **2. ASPECTOS MOLECULARES EN LAS CRANEOSINOSTOSIS.**

En los últimos años por medio de estudios moleculares de casos familiares de síndromes con craneosinostosis ha sido posible identificar algunos genes responsables de estas entidades siendo los más frecuentes los genes que codifican para los receptores de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFRs) (Heutink y cols.1995).

Los receptores de factores de crecimiento fibroblásticos constituyen una familia de cuatro genes denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, los cuales codifican para cuatro glicoproteínas que pertenecen a la familia de receptores tirosin-cinasa; mapeando a cromosomas diferentes: 10, 8, 4 y 5 respectivamente (Givol y Yayon, 1992).

Su estructura se caracteriza por los siguientes dominios: a) tres dominios extracelulares de unión a ligando semejantes a inmunoglobulinas; b) un dominio transmembranal seguido de una porción yuxtamembranal grande, c) un dominio tirosin cinasa interrumpido por una pequeña inserción de 14 aminoácidos y d) una cola carboxilo-terminal que contiene tirosinas susceptibles de fosforilación al unirse el ligando. (Givol y Yayon, 1992; Johnson y cols., 1993).

El ligando de los FGFRs son los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs). Los FGFs son una familia de 9 miembros que estimulan la proliferación de diversos tipos celulares, poseen potentes actividades neurotrópicas y angiogénicas, y tienen la capacidad de inducir o inhibir la

diferenciación, o bien mantener el fenotipo diferenciado de células en cultivo. Se sospecha que también tienen un papel importante durante el desarrollo embrionario. (Johnson y cols., 1991; Wilkie y cols, 1995).

### **3. ASPECTOS MOLECULARES DEL GEN FGFR3.**

El gen FGFR3 se ha reconocido como responsable de algunos casos de craneosinostosis aislada y se localiza en 4p16.3 ( Keegan y cols, 1991). Este gen presenta 19 exones y 18 intrones que abarcan 16.5 kb. En el extremo 5' del gen existe una zona de 770 bp que corresponden a una isla CpG. No se han detectado cajas TATA o CAAT, sin embargo, existen varios sitios potenciales de unión de factores de transcripción en la región correspondiente al promotor (Pérez-Castro y cols. 1997; Givol y Yayon, 1992).

Se ha demostrado que el FGFR3 se expresa en el cartílago de las placas de crecimiento de los huesos largos durante la osificación endocondral, y se ha detectado en cerebro y médula espinal en desarrollo (Deng y cols., 1996; Johnson y cols., 1991). Aparentemente la expresión durante la vida adulta se concentra en colon, hígado, apéndice, glándula sublingual, placenta y cérvix uterino, vasos sanguíneos y de manera muy llamativa en los islotes de Langerhans del páncreas. Poco se ha descrito acerca de su expresión en huesos con osificación membranosa o en huesos craneofaciales (Hughes, 1997).

El producto del gen FGFR3 es una proteína transmembranal de 125 kDa constituida por tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig-like), correspondientes a la categoría de cadenas constantes, un dominio transmembranal y dos tirosin cinasa (Fig.1) (Keegan y cols., 1990). La unión del ligando al FGFR da lugar a la dimerización del receptor (Fig. 2), el cual en su forma activa interactúa con un grupo de proteínas mediadoras que intervienen en la vía de Ras para activar a este último (Fig. 3) (Kanai y cols, 1997; Hughes, 1997).

#### 4. MUTACIONES EN FGFR3.

Actualmente se han descrito varias mutaciones en el FGFR3 en pacientes con displasias óseas que se heredan con un patrón autosómico dominante y cursan con talla baja como la Acondroplasia, la Hipocondroplasia y la Displasia Tanatofórica (Fig. 4) (Tabla 1). Las mutaciones descritas en estas displasias óseas confieren al gen una ganancia de función que conduce a la represión de la proliferación y maduración de condrocitos de manera constante (Bonaventure y cols., 1997; Rousseau y cols., 1994; Shiang y cols., 1994; Deng y cols., 1996).

En 1995, Meyers y cols. identificaron una mutación en el gen FGFR3 en 4 pacientes con síndrome de Crouzon y acantosis nigricans, siendo ésta la primera vez en que dicho gen se asociaba con craneosinostosis (Fig. 4) (Tabla 1) (Meyers y cols., 1995).

Posteriormente, Bellus y cols. en 1996 analizaron dos familias con craneosinostosis cuyas características clínicas sugerían el diagnóstico de síndrome de Pfeiffer, al analizar el exón 7 del gen FGFR3 detectaron una transversión de C → G en la posición 749 que da lugar al cambio de una prolina por una arginina en la posición 250 de la proteína (Pro250Arg). Al realizar el análisis de esta mutación en 65 individuos con craneosinostosis con o sin malformaciones en extremidades Bellus y cols., encontraron la mutación en el 12.3% de los casos, de los cuales 5 se catalogaron como craneosinostosis no sindrómica. El estudio molecular de los familiares reveló la existencia de otros diez individuos con la mutación cuyo fenotipo fue muy variable ya que algunos presentaron craneosinostosis coronal bilateral, otros craneosinostosis coronal unilateral o macrocefalia; clínicamente las manos y pies tenían una apariencia normal, pero radiológicamente varios de ellos presentaron falanges medias cortas y anchas en manos, falange media de ortijos hipoplásica o ausente y fusiones carpales y/o tarsales.

Con base en lo anterior, Moloney y cols. (1997) realizaron un estudio en el cual se buscó la mutación Pro250Arg en 26 pacientes no emparentados con craneosinostosis coronal uni o bilateral no sindrómica mostrando que 8 de ellos tenían la mutación en estado heterocigoto (31%) de los cuales sólo dos casos tenían antecedentes familiares. Una de las conclusiones más importantes de este estudio y de otros posteriores es la gran variabilidad de expresión de la mutación Pro250Arg, ya que la presencia de la misma en algunos individuos condiciona alteraciones tan discretas que a la exploración clínica se consideran individuos sanos pero son

transmisores de la enfermedad (LaJeunie y cols., 1995; Muenke y cols., 1997; Reardon y cols., 1997; Golla y cols., 1997).

## **JUSTIFICACION**

Las características clínicas de los pacientes con craneosinostosis coronal no sindrómica no permiten distinguir los casos esporádicos de los casos familiares, lo cual determina que el asesoramiento genético se otorgue con base en el riesgo empírico. Recientemente se ha descrito la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 en un grupo de pacientes con craneosinostosis coronal y en algunos de sus familiares clínicamente sanos, pero que después de una búsqueda intencionada muestran mínimas alteraciones radiológicas. En estos casos el asesoramiento genético se modifica de manera importante, ya que los individuos con la mutación Pro250Arg tienen un riesgo del 50% de transmitirla a su descendencia.

En el Instituto Nacional de Pediatría en los servicios de Neurocirugía, Cirugía Plástica y Genética se atienden en promedio 23 pacientes con craneosinostosis cada año, de los cuales aproximadamente el 17% corresponde a craneosinostosis coronal no sindrómica. Para ofrecer un asesoramiento genético más certero a estas familias, es necesario contar con estrategias moleculares que permitan identificar la mutación Pro250Arg en pacientes con craneosinostosis coronal no sindrómica así como en sus familiares para descartar casos de no penetrancia o identificar aquellas familias con una expresividad muy variable. Por lo anterior en el laboratorio de Biología Molecular se estandarizaron las metodologías que permiten identificar la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 tanto en el paciente como en sus familiares de 1er. grado y de acuerdo a ello se brindó asesoramiento genético.

transmisores de la enfermedad (LaJeunie y cols., 1995; Muenke y cols., 1997; Reardon y cols., 1997; Golla y cols., 1997).

## JUSTIFICACION

Las características clínicas de los pacientes con craneosinostosis coronal no sindromática no permiten distinguir los casos esporádicos de los casos familiares, lo cual determina que el asesoramiento genético se otorgue con base en el riesgo empírico. Recientemente se ha descrito la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 en un grupo de pacientes con craneosinostosis coronal y en algunos de sus familiares clínicamente sanos, pero que después de una búsqueda intencionada muestran mínimas alteraciones radiológicas. En estos casos el asesoramiento genético se modifica de manera importante, ya que los individuos con la mutación Pro250Arg tienen un riesgo del 50% de transmitirla a su descendencia.

En el Instituto Nacional de Pediatría en los servicios de Neurocirugía, Cirugía Plástica y Genética se atienden en promedio 23 pacientes con craneosinostosis cada año, de los cuales aproximadamente el 17% corresponde a craneosinostosis coronal no sindromática. Para ofrecer un asesoramiento genético más certero a estas familias, es necesario contar con estrategias moleculares que permitan identificar la mutación Pro250Arg en pacientes con craneosinostosis coronal no sindromática así como en sus familiares para descartar casos de no penetrancia o identificar aquellas familias con una expresividad muy variable. Por lo anterior en el laboratorio de Biología Molecular se estandarizaron las metodologías que permiten identificar la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 tanto en el paciente como en sus familiares de 1er. grado y de acuerdo a ello se brindó asesoramiento genético.

## **OBJETIVOS**

### **1. General.**

Determinar si la mutación Pro250Arg del gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal aislada en algunos de los pacientes que acuden al Instituto Nacional de Pediatría.

### **2. Específicos**

Determinar la frecuencia de la mutación Pro250Arg en la población de pacientes con craneosinostosis coronal aislada.

Identificar casos de no penetrancia o expresividad variable mediante el estudio clínico, radiológico y molecular de los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique la mutación.

Brindar un asesoramiento genético de certeza con base en los resultados del estudio molecular.

## **HIPOTESIS**

La mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal no sindrómica en algunos pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

## **CLASIFICACION DE LA INVESTIGACION**

Estudio clínico, observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Criterios de inclusión:**

Se incluyeron aquellos pacientes con craneosinostosis coronal unilateral o bilateral primaria documentada con estudio radiológico y TAC de cráneo, que no forme parte de una entidad sindrómica y que acudieron a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, así como los familiares de 1er grado.

## **OBJETIVOS**

### **1. General.**

Determinar si la mutación Pro250Arg del gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal aislada en algunos de los pacientes que acuden al Instituto Nacional de Pediatría.

### **2. Específicos**

Determinar la frecuencia de la mutación Pro250Arg en la población de pacientes con craneosinostosis coronal aislada.

Identificar casos de no penetrancia o expresividad variable mediante el estudio clínico, radiológico y molecular de los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique la mutación.

Brindar un asesoramiento genético de certeza con base en los resultados del estudio molecular.

## **HIPOTESIS**

La mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal no sindrómica en algunos pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

## **CLASIFICACION DE LA INVESTIGACION**

Estudio clínico, observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Criterios de inclusión:**

Se incluyeron aquellos pacientes con craneosinostosis coronal unilateral o bilateral primaria documentada con estudio radiológico y TAC de cráneo, que no forme parte de una entidad sindrómica y que acudieron a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, así como los familiares de 1er grado.

## **OBJETIVOS**

### **1. General.**

Determinar si la mutación Pro250Arg del gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal aislada en algunos de los pacientes que acuden al Instituto Nacional de Pediatría.

### **2. Específicos**

Determinar la frecuencia de la mutación Pro250Arg en la población de pacientes con craneosinostosis coronal aislada.

Identificar casos de no penetrancia o expresividad variable mediante el estudio clínico, radiológico y molecular de los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique la mutación.

Brindar un asesoramiento genético de certeza con base en los resultados del estudio molecular.

## **HIPOTESIS**

La mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal no sindrómica en algunos pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

## **CLASIFICACION DE LA INVESTIGACION**

Estudio clínico, observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Criterios de inclusión:**

Se incluyeron aquellos pacientes con craneosinostosis coronal unilateral o bilateral primaria documentada con estudio radiológico y TAC de cráneo, que no forme parte de una entidad sindrómica y que acudieron a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, así como los familiares de 1er grado.



## **OBJETIVOS**

### **1. General.**

Determinar si la mutación Pro250Arg del gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal aislada en algunos de los pacientes que acuden al Instituto Nacional de Pediatría.

### **2. Específicos**

Determinar la frecuencia de la mutación Pro250Arg en la población de pacientes con craneosinostosis coronal aislada.

Identificar casos de no penetrancia o expresividad variable mediante el estudio clínico, radiológico y molecular de los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique la mutación.

Brindar un asesoramiento genético de certeza con base en los resultados del estudio molecular.

## **HIPOTESIS**

La mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 es la causa de craneosinostosis coronal no sindrómica en algunos pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

## **CLASIFICACION DE LA INVESTIGACION**

Estudio clínico, observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Criterios de inclusión:**

Se incluyeron aquellos pacientes con craneosinostosis coronal unilateral o bilateral primaria documentada con estudio radiológico y TAC de cráneo, que no forme parte de una entidad sindrómica y que acudieron a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, así como los familiares de 1er grado.

**Criterios de exclusión:**

Se excluyeron los pacientes que en el momento del estudio habían sido transfundidos en los últimos tres meses.

**Población de estudio.**

Se incluyeron 16 pacientes que acudieron a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría con el diagnóstico de craneosinostosis coronal uni o bilateral no sindrómica, así como a sus familiares de primer grado. Se realizó una historia clínica que incluyó un árbol genealógico para distinguir los casos únicos de los familiares, así como una exploración física intencionada para descartar datos sugestivos de una entidad sindrómica, estudio de imagen que consistió en la toma de radiografías simple de cráneo en proyección antero-posterior y lateral así como una tomografía axial computada de cráneo con reconstrucción tridimensional que comprobaron la sinostosis. A los familiares de primer grado se les realizó radiografía simple de cráneo en dos proyecciones para descartar datos mínimos de afección.

**Creación de un banco de DNA.**

Se creó un banco de DNA de los pacientes con craneosinostosis coronal no sindrómica y sus familiares de 1er. grado, para lo cual se extrajeron 10 ml. de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante. El DNA se obtuvo de leucocitos utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Blin y Stafford., 1976).

### **Cuantificación del DNA.**

Se diluyeron 2  $\mu$ l de la muestra de DNA en 498  $\mu$ l de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Para cuantificar la concentración de DNA se aplicó la siguiente fórmula:

$$(D:O) (F) (\text{dil}) = (\text{DNA}) \mu\text{g/ml}$$

donde:

D.O. = densidad óptica a 260 nm.

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D.O.)

dil = volumen de dilución equivalente a 250  $\mu$ l

### **Integridad del DNA.**

La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis, mezclando 1  $\mu$ l de la muestra con 2  $\mu$ l de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%:0.05%) y 7  $\mu$ l de agua estéril. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 minutos a 100 voltios en un gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio; posteriormente el DNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta y se tomaron las fotografías.

### **Identificación de la mutación Pro250Arg.**

Para identificar la mutación Pro250Arg se amplificó el exón 7 del gen FGFR3 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se digirió con la enzima de restricción NciI.

#### **a) Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.**

Para la PCR se utilizaron 200 ng de cada uno de los siguientes iniciadores:

F : (5'-AGTGACGGTGGTGGTGAGGGAG-3')

R : (5'-CCAAATCCTCACGCAACCC-3')

con el objeto de amplificar un fragmento de 337 pares de bases (bp) que incluye al exón 7 (191 bp) y 196 bp del intrón adyacente. Se utilizaron 5 U de Taq polimerasa con 2.5 µl de buffer de reacción, 20mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de cada uno de los trinucleótidos dATP, dGTP, dTTP, dCTP, dimetilsulfóxido al 10% y 1 µl de DNA de cada muestra problema. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Perkin-Elmer 9600 bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial durante 4 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 63°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Posteriormente se sometieron a una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se tomaron 8 µl del producto para analizarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (Moloney y cols.,1997; Gyapay y cols.,1994).

#### **b) Restricción con NciI del producto amplificado.**

La restricción del fragmento obtenido por PCR se llevó a cabo con la enzima NciI (New England Biolabs, USA), mediante una incubación a 37°C durante 16 horas, para la cual se utilizaron 10 U de enzima, 2µl de buffer específico y 15 µl del DNA amplificado. Los alelos normales presentaron sólo un sitio de corte, lo cual da lugar a un fragmento de 214 bp y 123 bp, mientras que la presencia de la mutación Pro250Arg (C749G) crea un sitio de restricción adicional, dando lugar a fragmentos de 151 bp, 63 bp y 123 bp. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. (Bellus y cols., 1997; Moloney y cols., 1997).

## RESULTADOS

### 1. Análisis clínico.

Se estudiaron 16 familias con craneosinostosis coronal no sindromática. De los casos índice el 50% fueron masculinos y 50% femeninos, con una edad promedio de 36 meses (rango 5 a 78 meses de edad). En 13 familias el caso índice era el único afectado, mientras que en las otras tres, además del caso índice se refirió que otro familiar estaba afectado. En el árbol genealógico de estas últimas familias en dos no se identificó un patrón de herencia definido, mientras que en la tercera se observó un patrón que sugería herencia autosómica recesiva, dado que ambos padres se referían normales con dos hijas afectadas; sin embargo, en este caso el padre no acudió para revisión, por lo cual no se pudo descartar que se tratara de una herencia autosómica dominante (Fig. 5).

Como antecedentes prenatales de importancia cabe mencionar tres casos que tuvieron exposición a fármacos que se han relacionado previamente de manera anecdótica como causales de craneosinostosis, en dos pacientes existía el antecedente de aplicación tópica en la madre de Oximetazolina en el primer trimestre de la gestación y un caso en que la madre recibió Difenilhidantoína en el tercer mes de embarazo. En la Tabla 2 se resumen los demás antecedentes prenatales ninguno de los cuales se consideró que tenían relación etiológica con la craneosinostosis.

En la exploración física, tres de los pacientes presentaron, además de la craneosinostosis, retraso psicomotor leve y uno talla baja. La morfología craneal y las dismorfias encontradas en los 16 pacientes se describen en la Tabla 2, siendo las más frecuentes la plagiocefalia y la braquicefalia, así como el epicanto interno y las fisuras palpebrales hacia abajo respectivamente. En la mitad de los casos se observaron alteraciones menores en las extremidades siendo estas muy variables (Tabla 2); dos de los pacientes presentaron alteraciones múltiples, uno con aducto de antepie derecho, valgo de rodillas y segundo orjejo de mayor longitud que el primero; mientras que el otro paciente presentó braquidactilia en manos así como clinodactilia del 5to. dedo y pliegues palmares aberrantes.

En todos los casos se descartó que las alteraciones clínicas formaran parte de una entidad sindromática.

El estudio radiológico de los pacientes documentó sinostosis únicamente en suturas

coronales en 11 de ellos (68.75%), de estos pacientes, 6 (37.5%) tuvieron craneosinostosis unicoronal siendo la mitad de los casos derecha y la otra mitad izquierda, y 5 pacientes (31%) presentaron sinostosis coronal bilateral. El 31% de los casos (n = 5) tuvieron además de la sinostosis coronal, afección de la sutura lambdoidea, 3 de ellos (18.75%) mostraron craneosinostosis unicoronal y 2 (12.5%) sinostosis bicoronal.

## **2. Estudio molecular.**

En todos los casos la concentración de DNA obtenida osciló entre 0.8 y 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y la integridad de éste fue óptima lo que permitió amplificar por PCR el exón 7 y el intrón adyacente del gen FGFR3 (Fig. 6).

El patrón de la restricción del producto amplificado por PCR con la enzima NciI reveló la presencia del alelo normal en 15 casos índice, ya que este evidenció la presencia de dos bandas con un peso molecular de 214 pb y 123 pb (Fig. 7). En uno de los casos índice (paciente 11) se observó un patrón de restricción consistente en tres bandas con pesos moleculares de 151, 123 y 63 pb con lo cual se estableció la presencia de la mutación Pro250Arg en estado heterocigoto en el paciente (Fig. 8).

El estudio familiar de este caso (paciente 11), demostró que el padre del niño presentaba un alelo normal y otro con la mutación Pro250Arg mientras que la madre y su hermano mayor eran homocigotos normales (Fig. 9).

## **3. Cuadro clínico del paciente 11 (Pro250Arg/N).**

El caso índice con la mutación Pro250Arg es un varón de 15 meses de edad con diagnóstico de craneosinostosis coronal bilateral sin antecedentes prenatales de importancia, fue obtenido por cesárea a las 40 semanas de gestación por desproporción céfalo-pélvica y sufrimiento fetal agudo, con un peso al nacer de 4,300 grs, una talla de 52 cms y un Apgar 8/9. Su desarrollo psicomotor se consideró dentro de límites normales y a la exploración clínica intencionada se observó peso y talla dentro de percentilas normales, sin embargo su perímetro cefálico se encontró por debajo de la percentila 3. La exploración craneofacial mostró un cráneo braquitruricéfalo con frontal prominente y presencia de pico de viuda (Fig. 10), fisuras

palpebrales hacia abajo, órbitas poco marcadas con hipoplasia medio facial y en el paladar blando presentaba un rafe medio. En tórax y abdomen no se encontraron alteraciones mientras que en los genitales se observó fimosis severa. En las extremidades se presentó braquidactilia en manos y pies, clinodactilia de 5° dedo bilateral así como pliegues palmares aberrantes con pliegue equivalente transversal bilateral. En los estudios de gabinete las radiografías comparativas de manos y pies corroboraron la presencia de hipoplasia de falanges medias y distales mientras que una tomografía axial computada cerebral mostró atrofia cortical frontotemporal como hallazgo adicional a la sinostosis coronal (Figs.11 y 12).

El padre del paciente de 29 años de edad fue diagnosticado sano previamente al estudio molecular. Después del análisis molecular se le realizó una exploración física intencionada donde se observó un perímetro cefálico dentro de límites normales, tendencia a la braquicefalia, fisuras palpebrales hacia abajo con hipoplasia medio facial y órbitas poco marcadas. Las manos y pies eran normales y no se encontraron otras alteraciones a la exploración física. El estudio radiológico del padre descartó alteraciones en las suturas craneales así como alteraciones en huesos de manos y pies (Fig. 13). En la tabla 3 se resumen los datos clínicos y radiológicos del paciente 11 y su padre con la mutación Pro250Arg. La madre del paciente compartía con él la braquidactilia en manos.

Con base en el resultado del estudio molecular de esta familia, se brindó asesoramiento a la pareja con un riesgo de recurrencia de 50% en futuros embarazos y en la descendencia del caso índice.

La frecuencia de la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 en la población estudiada fue de 6.25%.

## DISCUSION

La craneosinostosis es un padecimiento frecuente en la población, siendo más común la aislada que la sindrómica. La sutura coronal ocupa el segundo lugar de afección, precedida únicamente por la sutura sagital (Rimoin y cols.,1997; Cohen, 1991).

En la craneosinostosis aislada, la mayoría de los casos son esporádicos sin recurrencia familiar pero aproximadamente el 2% de las sinostosis sagitales y el 8% de las sinostosis coronales son familiares. El patrón de herencia es autosómico dominante con expresividad variable y una penetrancia incompleta.

Hasta hace pocos años el asesoramiento genético que se brindaba a las familias con un caso único de craneosinostosis coronal se basaba exclusivamente en riesgos empíricos, sin embargo, se sabe que ante un caso único de craneosinostosis coronal aislada existen tres posibilidades:

- a) la craneosinostosis no tiene una etiología hereditaria y por lo tanto no existe riesgo de recurrencia en la familia,
- b) la craneosinostosis es de origen hereditario, pero es un caso único porque hay no penetrancia o expresividad variable en alguno de los progenitores, por lo anterior ambos padres se consideran clínicamente sanos, sin embargo, el riesgo de recurrencia en los hermanos del paciente es de un 50%, o bien
- c) la craneosinostosis es originada por una mutación de novo por lo que el riesgo de recurrencia será de un 50% sólo en la descendencia del paciente.

En 1996 cuando se identificó una mutación puntual única en el gen FGFR3 (Pro250Arg) como causa de craneosinostosis coronal no sindrómica (Heutink y cols.1995; Bellus y cols., 1996). En la actualidad la detección por técnicas de Biología Molecular de dicha mutación, permite identificar a un subgrupo de pacientes con craneosinostosis coronal no sindrómica con una herencia autosómica dominante lo cual permite el diagnóstico de certeza y la identificación de los casos de no penetrancia y/o expresividad variable para otorgar un asesoramiento genético adecuado.

En el Instituto Nacional de Pediatría a la consulta externa de Neurocirugía y/o Cirugía Plástica acude un promedio de 23 pacientes con craneosinostosis cada año, mientras que en la



consulta externa de Genética se atiende a un promedio de 18 pacientes con craneosinostosis por año. De estos, aproximadamente la mitad de los casos corresponde a craneosinostosis no sindrómica, siendo la mayoría casos únicos en su familia, por lo que el asesoramiento genético es empírico. Con el fin de contribuir al diagnóstico y mejorar el asesoramiento genético en el presente trabajo se analizó una población de 16 pacientes con craneosinostosis coronal no sindrómica, para determinar si ésta fue ocasionada por la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3 e identificar en el estudio familiar casos de no penetrancia o expresividad variable.

La proporción de pacientes masculinos y femeninos no mostró diferencias. El 54.5% tuvo afección coronal unilateral y el 45.4% mostró sinostosis de ambas suturas coronales. Estos últimos datos son concordantes con lo reportado para casos esporádicos ya que en la literatura se refiere que la sinostosis coronal unilateral y bilateral se presentan con frecuencia similar. En los casos familiares pueden coexistir ambas variantes en la misma familia, aunque la proporción de bilateral: unilateral es 3:1, comparado con la relación 1:1 de los casos esporádicos. En términos generales se reporta un discreto predominio del sexo femenino en ambas variantes. (Rimoin y cols.,1997; Cohen, 1991). El análisis de los casos familiares incluidos en este estudio no fue posible dado que esos sólo fueron tres; no obstante, los resultados obtenidos de este trabajo documentan un caso familiar con craneosinostosis coronal con expresividad variable que previamente se había catalogado como esporádico (paciente 11).

En la familia del paciente 11 el patrón hereditario es autosómico dominante como se ha descrito en los casos familiares de craneosinostosis con la mutación Pro250Arg; sin embargo, en nuestra población de estudio los tres casos que refirieron algún otro familiar afectado no mostraron un árbol genealógico sugestivo de este tipo de herencia e incluso una de nuestras familias mostró un patrón de herencia autosómico recesivo ya que se refirió que ambos padres eran sanos con dos hijas afectadas, sin embargo en esta familia el padre no acudió a consulta para revisión por lo que no se puede descartar un patrón de herencia autosómico dominante con expresividad variable.

Por otra parte se ha descrito de manera anecdótica que la exposición prenatal a algunos fármacos, como la oximetazolina o difenilhidantoina, puede causar craneosinostosis (Cohen, 1991), en nuestra población 2 de 16 pacientes referían este antecedente, sin embargo se incluyeron en este estudio, dado que los datos en la literatura son controversiales con relación a si

dichos fármacos son responsables de la alteración. Actualmente se sugiere que el considerar que la sinostosis fue originada por agentes farmacológicos debe ser un diagnóstico de exclusión después de haber descartado otros factores causales.

En las series de casos reportados en la literatura con el llamado Síndrome de Muenke, en el cual la craneosinostosis coronal es debida a la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3, han sugerido una gran variabilidad de expresión en el mismo, con un espectro fenotípico que va desde la aparente normalidad hasta el cráneo en trébol, pasando por la craneosinostosis coronal unilateral, bilateral y la afección de alguna otra sutura (Bellus y cols, 1996; Golla y cols, 1997). Una proporción importante de los pacientes identificados con la mutación Pro250Arg en el gen FGFR3, tenían diagnósticos previos de alguna otra craneosinostosis sindromática, principalmente síndrome de Saethre-Chotzen y de Pfeiffer (Graham y cols, 1998). Extracranealmente, el hallazgo más frecuente son las alteraciones en extremidades, principalmente la braquidactilia, la hipoplasia de falanges medias y distales y la fusión de huesos del carpo y/o tarso (Tabla 3) (Graham y cols, 1998).

En el grupo de pacientes estudiado por nosotros en 1 de 16 casos se demostró la mutación Pro250Arg, los pacientes analizados presentaron alteraciones en extremidades en el 50% de los casos, si bien 2 niños sólo mostraban pliegues palmares aberrantes. La alteración que con mayor frecuencia encontramos fue la braquidactilia, principalmente en manos, dato más relevante en las extremidades del paciente que presentó la mutación Pro250Arg quien tenía algunas otras alteraciones en extremidades superiores tales como la clinodactilia de 5° dedo y los pliegues palmares aberrantes. Estos datos sugieren que las alteraciones de extremidades no son exclusivas de los pacientes afectados con la mutación Pro250Arg, por lo que no permiten distinguir clínicamente a los pacientes afectados con la mutación de los no afectados (Tabla 2).

La frecuencia reportada de la mutación Pro250Arg en pacientes con craneosinostosis ha sido muy variable, el estudio de Moloney y cols, reportó la frecuencia más alta en el 31% de 26 pacientes con craneosinostosis coronal uni o bilateral catalogada como no sindromática. Una frecuencia intermedia, de 11% y 12.3% fue reportada en el estudio de Gripp y cols, (casos esporádicos con sinostosis unilateral) y por Bellus y cols. (craneosinostosis no sindromática esporádica o familiar) respectivamente. Finalmente, Reardon en 1997 detectó la mutación en el 5.5% en un grupo de pacientes que estudió, los cuales eran tanto casos esporádicos como

familiares. Passos-Bueno y cols, en 1999 reportaron dos pacientes con craneosinostosis considerada sindrómica (uno con síndrome de Crouzon y el otro con síndrome de Pfeiffer) que presentaron la mutación Pro250Arg, y correspondieron al 5% de su muestra de estudio. La frecuencia de la mutación Pro250Arg en población mexicana no se puede establecer con este estudio dado que la muestra es pequeña; sin embargo, la frecuencia observada en este grupo de casos con craneosinostosis coronal aislada fue de 6.25%, la cual puede considerarse menor a la descrita en la literatura.

Actualmente se conoce bien la extrema variabilidad fenotípica, tanto a nivel inter como intrafamiliar, de los individuos que presentan en estado heterocigoto la mutación Pro250Arg además de que se han descrito casos con no penetrancia (Muenke, 1997; Robin y cols; 1998). Lo anterior se corroboró en el presente estudio en la familia en la cual se detectó la mutación, ya que al hacer el interrogatorio intencionado de antecedentes familiares de craneosinostosis, la madre refirió que todos los familiares eran sanos y ambos padres se describieron como clínicamente normales. Al obtener el resultado molecular del paciente y determinar que la mutación le fue heredada del padre, se realizó una exploración física minuciosa en este último con el fin de establecer si presentaba manifestaciones mínimas de la enfermedad. Se llegó a la conclusión de que en esta familia existía expresividad variable ya que en el padre se descartó afección de las suturas craneales mediante el estudio radiológico pero clínicamente presentaba tendencia a la braquicefalia, fisuras palpebrales hacia abajo con hipoplasia medio facial y órbitas poco marcadas, estos últimos también se presentaron en el caso índice, que como se mencionó previamente además presentaba sinostosis coronal bilateral y alteraciones en extremidades (Tabla 4).

El hallazgo de esta familia pone de manifiesto la importancia de definir con precisión las características fenotípicas asociadas con la mutación Pro250Arg del gen FGFR3. La relevancia de este trabajo también se basa en su aplicación potencial en el diagnóstico temprano de la craneosinostosis coronal, como una vía de prevención del retraso mental secundario a esta patología y demuestra la necesidad de ofrecer el diagnóstico molecular a los individuos con craneosinostosis coronal no sindrómica, ya sea familiar o esporádica, para contar con un diagnóstico de certeza y un asesoramiento genético adecuado.

## BIBLIOGRAFIA

- Bellus G, Gaudenz K, Zackai E, Clarke L, Szabo J, Francomano C, Muenke M. (1996): Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet* 14:174-176.
- Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P. (1996): Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) account for Achondroplasia, Hypochondroplasia and Thanatophoric Dwarfism. *Am J Med Genet* 63:148-154.
- Cohen M. (1991): Etiopathogenesis of craniosynostosis. *Neurosurg Clin North Am* 2:507-512.
- Delashaw J, Persing J, Jane J. (1991): Cranial deformation craniosynostosis. A new explanation. *Neurosurg Clin North Am* 2:611-619.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. (1996): Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-921.
- Givol D, Yayon A. (1992): Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 6:3362-3369.
- Golla A, Lichtner P, von Gernet S, Winterpacht A, Fairley J, Murken J, Schuffenhauer S. (1997): Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation P250R in a large craniosynostosis family. *J Med Genet* 34:683-684.
- Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizame C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. (1994): The 1993-1994 Généthon human genetic linkage map. *Nat Genet* 7:246-339.
- Hall J, Froster-Iskenius UJ, Allanson J (1989): "Handbook of normal physical measurements". New York: Oxford University Press.
- Heutink P, Vermeij-Keers C, Oostra B. (1995): The genetic background of craniosynostosis syndromes. *Eur J Hum Genet* 3:312-323.
- Hughes S. (1997): Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem* 45:1005-1019.

- Johnson D, Williams L.(1991): Structural and functional diversity in the FGF Receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60:1-41.
- Kanai M, Goke M, Tsunekawa S, Podolsky DK. (1997): Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66kDa phosphoprotein. *J Biol Chem* 272:6621-6628.
- Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ. (1991): Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1095-1099.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaïti-Pellie C, Marchac D, Renier D. (1995): Genetic study of Nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 55:500-504.
- Mason YJ. (1994): The Ins and Outs of Fibroblast Growth Factors. *Cell* 78:547-552.
- Meyers G, Orlow S, Munro I, Przylepa K, Jabs E. (1995): Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet* 11:462-464.
- Moloney DM, Wall SA, Ashworth GJ, Oldridge M, Glass IA, Francomano CA, Muenke M, Wilkie AOM. (1997). Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. *Lancet* 349:1059-1062.
- Muenke M, Gripp KW, McDonald-MCGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Ades LC, Haan EA, Muley JC, Cohen MM Jr, Bellus GA, Francomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AO, et al. (1997): A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60: 555-564.
- Muenke M, Schell U. (1995): Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 11:308-313.
- Pasquale EB. (1990): A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5812-5816.
- Perez-Castro AV, Wilson J, Altherr MR. (1997): Genomic organization of the human fibroblast

growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and comparative sequence analysis with the mouse *fgfr3* gene. *Genomics* 41:10-16.

Reardon W, Wilkes D, Rutland P, Pulleyn L, Malcolm S, Dean J, Evans R, Jones B, Hayward R, Hall C, Nevin N, Baraitser M, Winter R. (1997): Craniosynostosis associated with FGFR3 Pro250Arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis. *J Med Genet* 34:632-636.

Rimoin D, Connor JM, Pyeritz R. (1997): "Emery and Rimoin's Principle and practice of medical genetics". 3<sup>rd</sup>. Edition. Boston: Churchill-Livingstone. pp 1128-1132.

Rousseau F, Bonaventure J, Legai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, Le Merrer M, Munnich A. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Nature* 371:252-254.

Shiang R, Thompson L, Zhu Y, Church D, Fielder T, Bocian M, Winokur S, Wasmuth J. (1994): Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78:335-342.

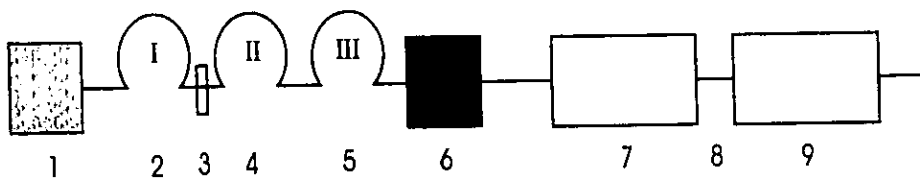
Stevenson R, Hall J, Goodman M (1993): "Human malformations and related anomalies". New York: Oxford University Press. pp 589-599.

Webster MK, Donoghue DJ. (1997): FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet* 13:178-182.

Wilkie AOM, Morris-Kay GM, Jones EY, Heath JK. (1995): Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol* 5:500-507.

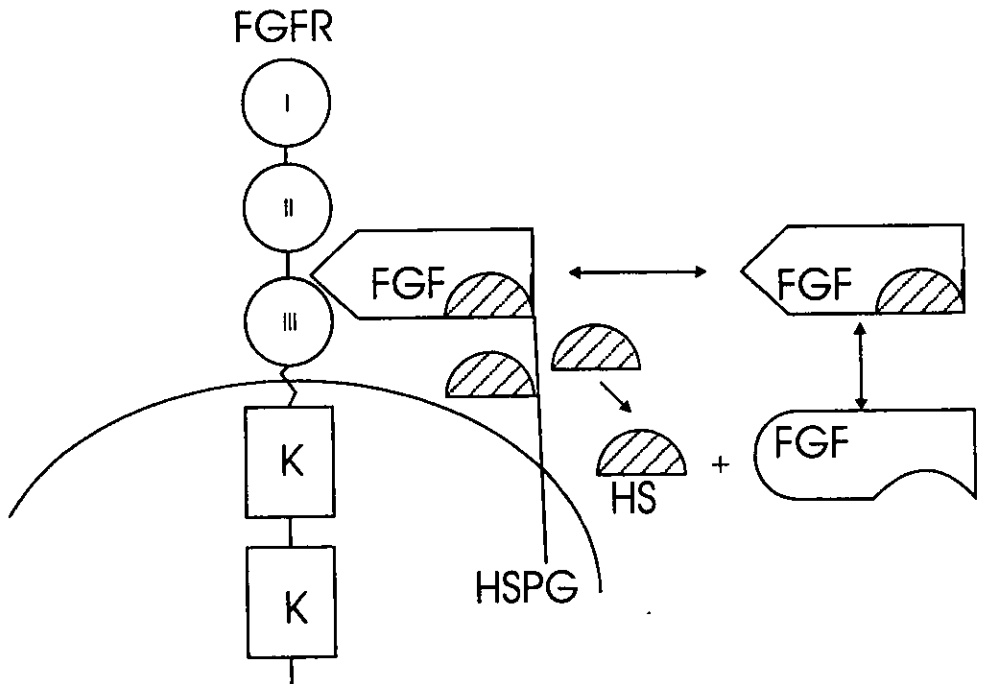
Wilkie AOM. (1997): Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Molec Genet* 6:1647-1656.

Wuechener C, Nordqvist AC, Winterpacht A, Zabel B, Schalling M. (1996): Developmental expression of splicing variants of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in mouse. *Int J Dev Biol* 40:1185-1188.



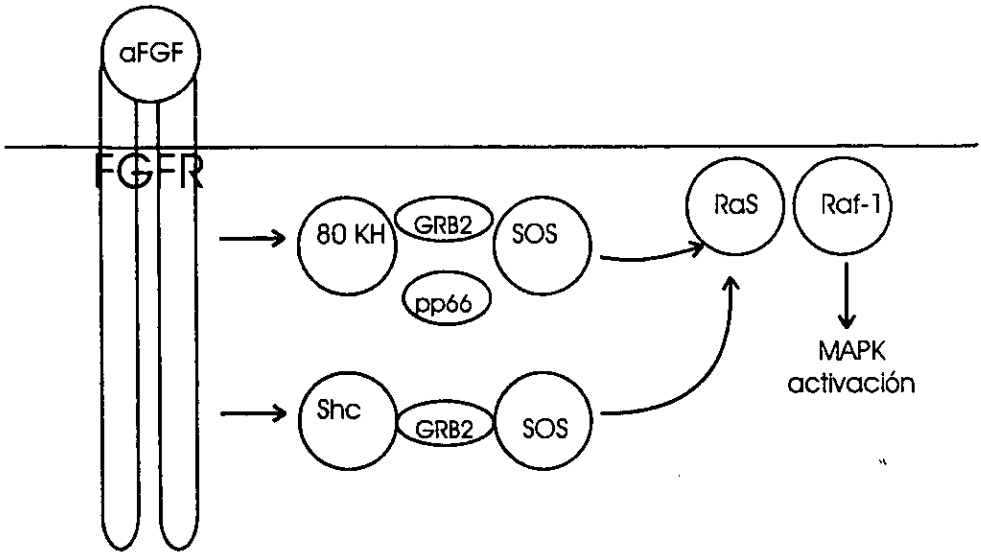
- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 Secuencia Líder          | 6 Dominio Transmembranal   |
| 2 Dominio similar a Ig I   | 7 Dominio Tirocin cinasa 1 |
| 3 Caja ácida               | 8 Interrupción             |
| 4 Dominio similar a Ig II  | 9 Dominio Tirocin cinasa 2 |
| 5 Dominio similar a Ig III |                            |

**Figura 1:** Representación esquemática de los dominios funcionales de la proteína FGFR3.

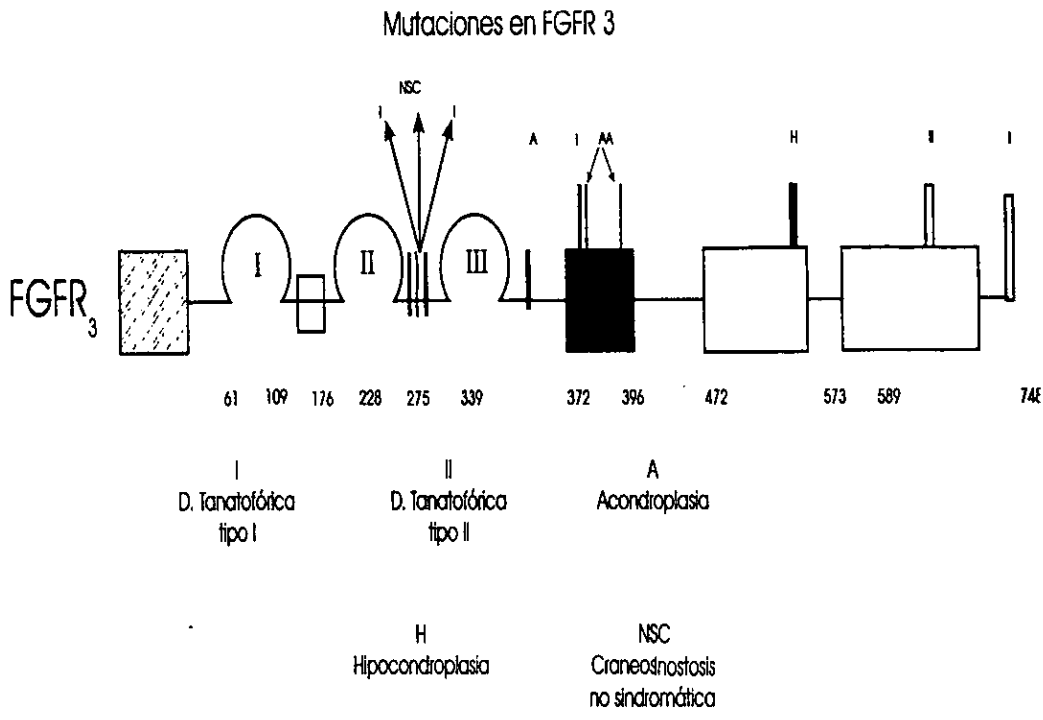


**Figura 2:** Modelo de la unión del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) con su ligando dependiente de heparina. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se une a su receptor de alta afinidad sólo cuando está unido a una molécula de heparina ya sea de la superficie celular o heparina soluble. Se propone un cambio conformacional del FGF al unirse a la heparina. HS: Heparán sulfato, HSPG: Heparán sulfato proteoglicano, K: dominio cinasa. (Tomado de Givol y cols, 1992)



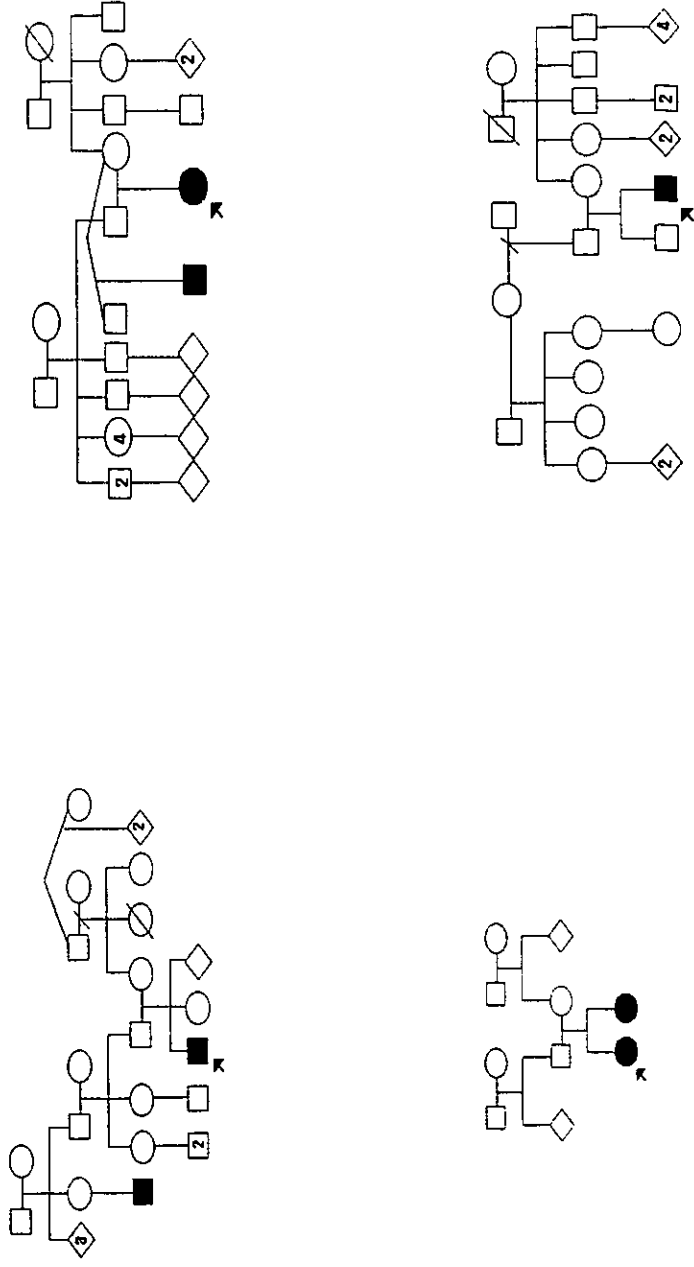


**Figura 3:** Representación esquemática de los complejos de señalización que interactúan con el FGFR3 activado. El FGFR3 activado interactúa con el complejo GRB2-Sos por medio del 80K-H fosforilado. Este complejo 80K-H-GRB2-Sos interactúa a su vez con una proteína no identificada de 66kDa, la cual se fosforila directamente por el FGFR3 activado. Este último también se une de manera indirecta al complejo GRB2-Sos mediante Shc. Por lo tanto el FGFR3 activado utiliza dos fuentes diferentes del complejo GRB2-Sos para establecer contacto con Ras.  
*(Tomado de Kanai y cols, 1997).*

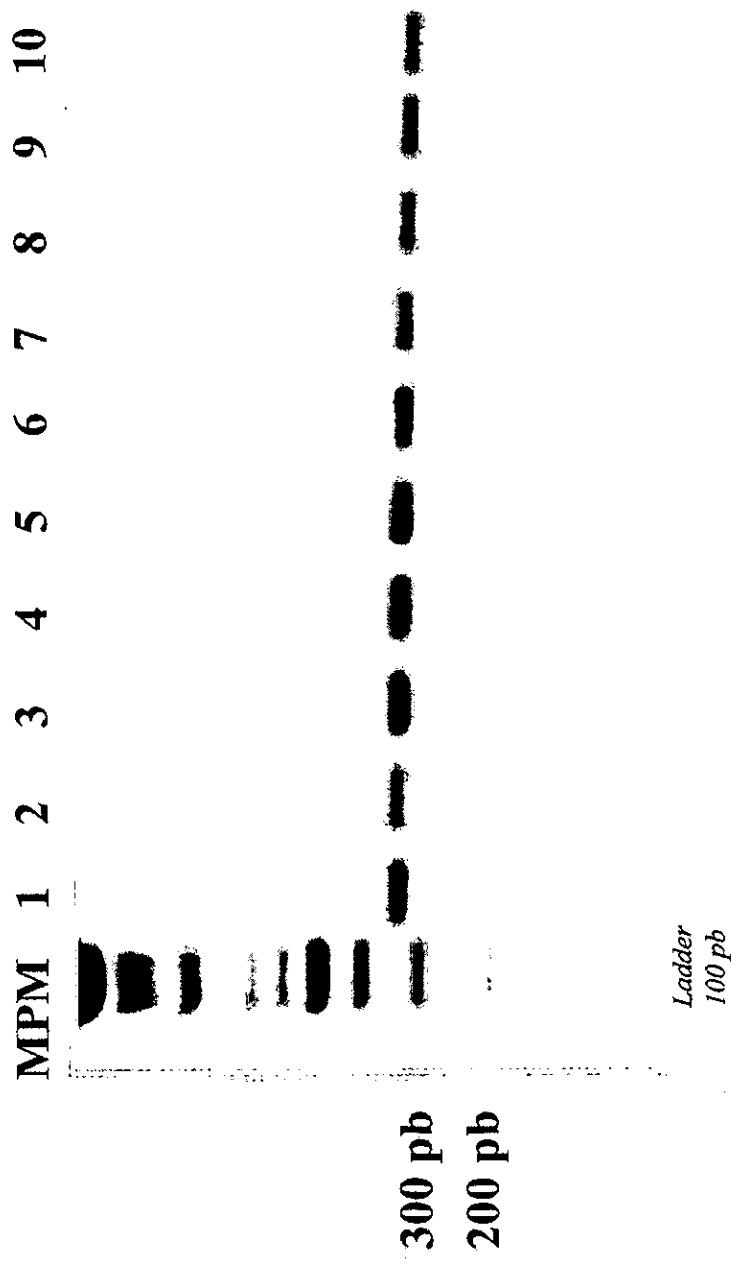


**Figura 4:** Mutaciones en FGFR3. *Adaptado de Webster y Donoghue, 1997.*

FIGURA 5: Arboles genealógicos de casos familiares.



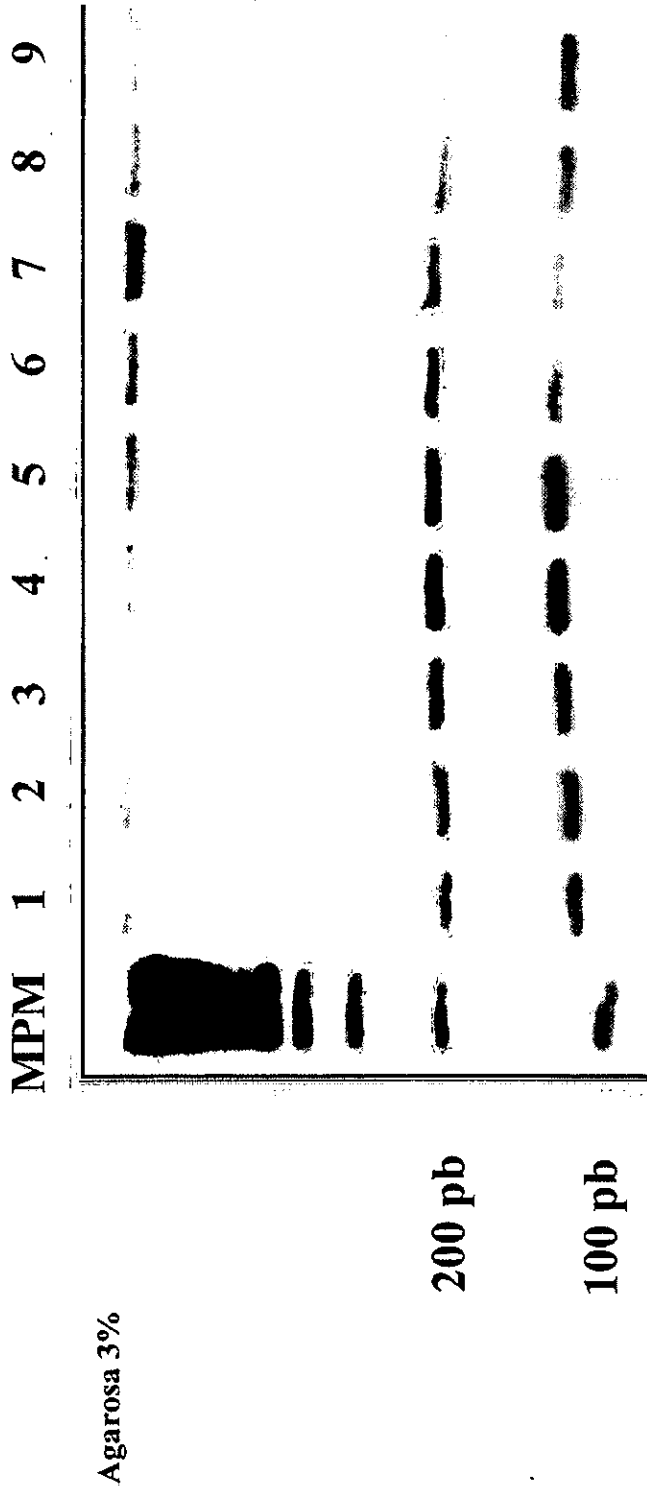
**Figura 6: AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR  
DEL EXÓN 7 DE FGFR3**



Agarosa 3%

La presente fotografía muestra los productos amplificados de los pacientes 1 a 10, cuyo tamaño es de 337 pb.

Figura 7: RESTRICCIÓN CON *NciI*



El patrón de restricción de los alelos normales revela la presencia de dos bandas: una con peso molecular de 214 pb y otra con peso de 123 pb. El marcador de peso molecular utilizado es *ladder* de 100bp.

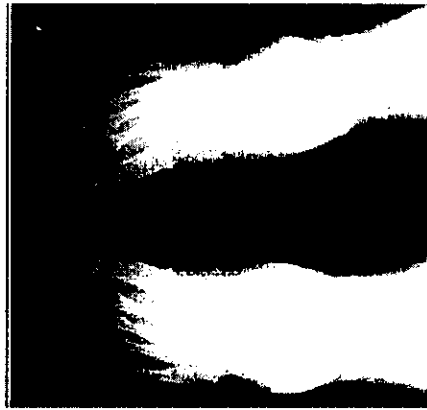
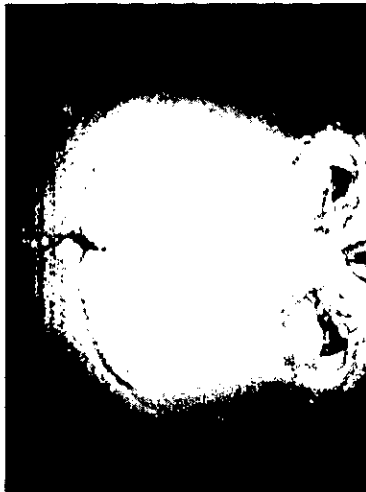


**Figura 9: PACIENTE H1 CON LA MUTACIÓN Pro250Arg**



Fotografías clínicas antero-posterior y lateral que muestran braquitricefalia, frontal prominente, fisuras palpebrales hacia abajo, órbitas poco marcadas e hipoplasia medio-facial.

**Figura 10: PACIENTE 11 CON LA MUTACIÓN  
Pro250Arg**



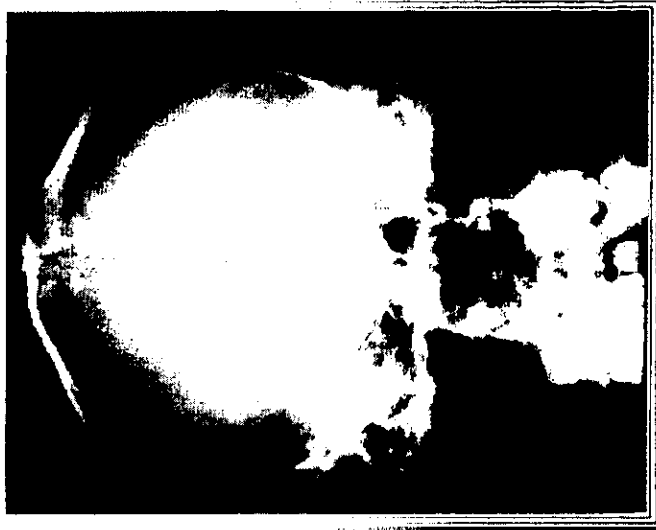
**Reconstrucción tomográfica tridimensional del cráneo del paciente, la cual muestra sinostosis coronal bilateral. Las radiografías simples de manos y pies corroboran la presencia de hipoplasia de falanges medias y distales.**



**Figura 11: PADRE CON LA MUTACIÓN Pro250Arg**



**Figura 12: PADRE CON LA MUTACIÓN Pro250Arg**



**Tabla 1.** Mutaciones descritas en el gen FGFR3 en diversas patologías.

<b>FGFR</b>	<b>SINDROME</b>	<b>MUTACIONES</b>
FGFR3	Acondroplasia	Gly380Arg (98%), Gly375Cys, Gly346Glu
	Hipocondroplasia	Asn450Lys
	Displasia tanatofórica tipo I	Arg248Cys, Ser249Cys, Gly370Cys, Ser371Cys, Tyr373Cys, Stop807Gly, Stop807Arg, Stop807Cys
	Displasia tanatofórica tipo II	Lys650Glu
	Crouzon con acantosis nigricans	Ala391Glu
	Craneosinostosis no sindromática	Pro250Arg
	Nueva displasia esquelética	Lys650Met

Adaptado de Webster y Donoghue, 1997.

**TABLA 2**

PACIENTE	DIAGNOSTICO	ANTECEDENTES PRENATALES	MORFOLOGIA CRANEAL	DISMORFIAS FACIALES	ALTERACIONES EN EXTREMIDADES
1	Craniosinostosis coronal derecha	Exposición a gas nafta	Plagiocefalia	Epicanto interno bilateral, pabellones auriculares acopados	Manos con pliegues palmares aberrantes bilaterales
2	Craniosinostosis coronal izquierda	DFH, Diazepam, CBZ. Paro cardiorrespiratorio	Plagiocefalia	Facies inexpresiva, hemangioma plano en dorso de nariz	---
3	Sinostosis coronal y lambdoidea izquierda	Amenaza de aborto, infección de vías urinarias	Plagiocefalia	---	---
4	Craniosinostosis coronal derecha	---	Plagiocefalia, braquicefalia	Fisuras palpebrales hacia abajo	Manos con braquidactilia leve bilateral
5	Craniosinostosis coronal izquierda	Amenaza de aborto	Plagiocefalia, acrocefalia	Pabellones auriculares con antiélix prominente	---
6	Craniosinostosis bicoronal	Oximetazolina nasal	Plagiocefalia, braquicefalia, prominencia biparietal	---	Manos con braquidactilia leve bilateral
7	Craniosinostosis bicoronal	---	Braquicefalia, prominencia bitemporal	Columnela corta, pseudoprogatismo, paladar ojival, antiélix prominente en pabellones auriculares	Aducto de antepie derecho, valgo de rodillas, 2° orjejo de mayor longitud que el 1°

**LA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

PACIENTE	DIAGNOSTICO	ANTECEDENTES PRENATALES	MORFOLOGIA CRANEAL	DISMORFIAS FACIALES	ALTERACIONES EN EXTREMEIDADES
8	Sinostosis bicoronal y lambdoidea	Infección de vías urinarias, ampicilina	Braquicefalia, prominencia biparietal	Epicanto interno, nariz en pico de loro, fisuras palpebrales hacia abajo	---
9	Sinostosis bicoronal	Otitis, antibiótico no especificado	Braquicefalia, turricefalia.	Hipoplasia mediofacial, hipertelorismo	Pies con 1er.ortejo ancho bilateral
10	Sinostosis coronal y lambdoidea derecha	Oximetazolina nasal, acetaminofen, ampicilina	Plagiocefalia	---	---
11	Craneosinostosis bicoronal	---	Braquicefalia, turricefalia	Pico de viuda, paladar blando con rafe medio prominente	Manos con braquidactilia, clinodactilia de 5° dedo, pliegues palmares aberrantes
12	Sinostosis bicoronal y lambdoidea	Infecciones recurrentes de vía aérea superior	Braquicefalia, turricefalia	Fronte estrecha hipertricótica, facies aplanada, fisuras palpebrales hacia abajo	Sindactilia cutánea leve en manos, y 1er.ortejo ancho en pies
13	Craneosinostosis bicoronal	Vulvovaginitis, ketoconazol vaginal, tabaquismo	Plagiocefalia	Epicanto interno, puente nasal deprimido	---
14	Craneosinostosis coronal derecha	----	Plagiocefalia	---	---

PACIENTE	DIAGNOSTICO	ANTECEDENTES PRENATALES	MORFOLOGIA CRANEAL	DISMORFIAS FACIALES	ALTERACIONES EN EXTREMIDADES
15	Craneosinostosis coronal y lambdoidea derecha	Amenaza de parto pretérmino	Plagiocefalia, asimetría facial	Ojo derecho mayor que el izquierdo, leve ptosis palpebral bilateral, nariz bulbosa, pabellones auriculares implantados asimétricamente	Manos con pliegues palmares aberrantes bilaterales
16	Craneosinostosis coronal izquierda	---	Braquicefalia	Facies triangular	---

DPH: Difenilhidantoína. CBZ: Carbamazepina

**TABLA 3**

	<b>PADRE</b>	<b>HIJO</b>
Perímetro cefálico	Percentila 50	Percentila 3
Braquicefalia	Leve	Braquiturricefalia
Fisuras palpebrales	Hacia abajo	Hacia abajo
Paladar	Normal	Rafé medio
Orbitas	Poco marcadas	Poco marcadas
Manos y pies	Normales	Braquidactilia, clinodactilia del 5° dedo, pliegues aberrantes.
Características radiológicas	RX manos, pies y cráneo normales	Sinostosis coronal bilateral, RX manos y pies con falanges hipoplásicas

**TABLA 4**

<i>Hallazgos clínicos</i>	<i>No. afectado/ No. examinado</i>	<i>% Afectado</i>	<i>Paciente 11</i>
<i>A. Craneofacial</i>			
Sinostosis bicoronal	41/68	60	Si
Sinostosis unicoronal	8/68	12	No
Hipoplasia mediofacial	17/34	50	Si
Fisuras palpebrales hacia abajo	24/43	56	Si
Hiptelorismo ocular	28/36	78	No
Ptosis palpebral	13/51	25	No
Pérdida auditiva	18/54	33	??
RPM/RM	24/68	35	No
<i>B. Manos y pies</i>			
Braquidactilia	22/55	40	Si
Clinodactilia	14/40	35	Si
Fusión carpal	8/25	32	??
Epífisis cónicas	9/27	33	??
1er. orjejo ancho	12/46	26	No
Fusión tarsal	7/27	26	??

*RPM: Retraso psicomotor. RM: Retraso mental*  
Muenke, 1997; Reardon, 1997; Golla, 1997 y Gripp 1998.

Adaptado de Graham y cols, 1998 quienes incluyeron datos de