

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
I.S.S.S.T.E. CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN FGFR₂ EN PACIENTES CON
CRANEOSINOSTÓISIS SINDROMÁTICAS.

No. DE REGISTRO DEL PROTOCOLO 040.2009

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO GENETISTA
PRESENTA:
DRA. ANA ALEJANDRA CALDERON GOVANTES

TUTORA DE TESIS:
DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN.

MEXICO D.F. FEBRERO 2009.



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.

DR. MAURICIO DI SILVIO LOPEZ.
Subdirector de Investigación y Enseñanza.

DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI.
Profesor Titular.

DRA. YURITZI SANTILLAN HERANDEZ.
Profesor Adjunto.

DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN.
Tutora e Tesis

DRA. ANA ALEJANDRA CALDERON GOVANTES
Tesisista.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por todas sus bendiciones y por ponerme en el lugar en el que le puedo servir.

A mis padres por ser mis guías, por haberme inculcado principios y valores, por su amor, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, y por que lo que soy se los debo a ustedes.

A mi hermano, por su apoyo incondicional, por levantarme el ánimo y hacerme reír en los momentos más difíciles

A mi abuelo Horacio por ser mi mayor ejemplo, por su apoyo y sus sabios consejos y por ser uno de los pilares de mi familia.

A mi abuelo Enrique por enseñarme que la vida no es fácil para muchos de nosotros.

A toda mi familia y amigos por creer en mí

A mis excelentes profesores: la Dra. Carnevale, Dra. Santillán, Dra. Urraca, Lic. Sandra y Dr. Galaviz por permitirme ser parte de este maravilloso proyecto.

A la Dra. Chima por su tiempo, dedicación y paciencia, a Liliana y Juan Carlos por su ayuda y apoyo durante estos 3 años y al resto de mis profesores, a quienes considero mis amigos Dra. Orozco, Dr. Zaragoza, Dr. Cano, Cony, Ceci, Inés, Roberto, Alberto, Dra. Aguinaga, Dr. Machin porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mis compañeros: Carla, Leonardo, Carolina, Marcela, Rocio, Marlene, Lalo y Paola, por todo lo que compartimos y aprendimos juntos, gracias por brindarme su amistad.

A la Dra. Jetzamin, Dr. Esparza, Dr. Di Silvio, por su apoyo y consejos durante estos 3 años.

A Alma, Perita, Cynthia y todas aquellas personas que hicieron mas agradable mi estancia en este lugar.

A los pacientes y a sus familias por confiar en nosotros y por darnos una lección de vida todos los días.

INDICE.

1. ANTECEDENTES	1
2. GENERALIDADES	10
3. OBJETIVOS	18
4. JUSTIFICACION	19
5. DISEÑO DEL ESTUDIO	20
6. MATERIALES Y METODOS	21
7. DESCRIPCION DE LOS PACIENTES	25
8. RESULTADOS	32
9. DISCUSION	37
10. ANEXOS	40
11. BIBLIOGRAFIA	42

ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN FGFR2 EN PACIENTES CON CRANEOSINOSTÓSIS SINDROMÁTICAS.

ANTECEDENTES.

La craneosinostosis, es una de las anomalías craneofaciales más comunes, con una prevalencia de 1 en 2,100-2,500 nacimientos¹ y se caracteriza por el cierre precoz de una o más suturas craneales¹.

Los casos severos de craneosinostosis causan distorsiones complejas de la anatomía craneal y se asocian con diversas complicaciones incluyendo: hipertensión intracraneal, hidrocefalia, sordera, problemas visuales, alteraciones dentales, problemas respiratorios y retraso mental².

La sutura es una capa delgada de tejido conjuntivo intermedio que se origina entre los huesos. Al nacimiento las suturas están separadas por tejido conjuntivo de tipo mesenquimatoso. Entre los seis meses y el año de edad los bordes quedan yuxtapuestos pero no se fusionan.

Conforme avanza la edad el tejido conjuntivo se va sustituyendo por tejido fibroso y hacia los 10 a 13 años las suturas se han cerrado; pero la verdadera osificación no ocurre sino hasta la cuarta o quinta década de la vida.

SUTURAS Y FONTANELAS	EDAD DE CIERRE
Sutura Metópica	9 meses – 2 años.
Sutura Sagital	40 años.
Sutura Coronal	40 años.
Sutura Lamboidea	40 años.
Fontanela Anterior	9 – 18 meses.
Fontanela Posterior	3 – 6 meses.
Fontanela Anterolateral	3 meses.
Fontanela Posterolateral	2 años.

Tabla 1 Edad de cierre de suturas y fontanelas. Adaptada de Aviv RI, Rodger E, Hall
MC Craniosynostosis Clin Radiol 2002;57:94

En total existen 37 suturas craneales, de ellas las que son clínicamente significativas en las craneosinostosis se disponen de la siguiente forma:

- 1.- Sutura Sagital: En línea media anteroposterior, entre los huesos parietales.
- 2.- Sutura Coronal: Entre el frontal y los parietales.
- 3.- Sutura Metópica: Entre las dos mitades del hueso frontal.
- 4.- Sutura Lamboidea: Entre los parietales y el occipital.

En los sitios donde se encuentran tres o cuatro huesos de la bóveda, las suturas se ensanchan para formar las fontanelas, como:

- 1.- Fontanela Anterior o Bregmática de forma cuadrangular, situada entre los dos parietales y las dos mitades del frontal.
- 2.- Fontanela Lamboidea que ocupa el espacio triangular entre los parietales y la concha del occipital.
- 3.- Otras fontanelas constantes son la ptérica o anterolateral y la astérica o posterolateral.



Fig. 1 Suturas y fontanelas. Tomado de Brash JC Texto de anatomía.

La fontanela bregmática debe cerrarse entre los 14 y 22 meses, la posterior entre el segundo y tercer mes de la vida; la ptérica o anterolateral alrededor de los tres meses y la astérica o posterolateral en el segundo año^{3,4}.

La forma en que el cráneo es alterado depende de que sutura se fusione prematuramente. La sinostosis de la sutura coronal causa braquicefalia, algunas variantes son la acrocefalia y oxicefalia (cabeza puntiaguda) o la turricefalia (cabeza en forma de torre). La sinostosis coronal unilateral origina plagiocefalia anterior, asociada con asimetría de cráneo y cara. La dolicocefalia se observa en la fusión prematura de la sutura sagital, una variante es la escafocefalia (cabeza en forma de quilla). La trigonocefalia o cabeza en forma triangular resulta del cierre prematuro de la sutura metópica. En algunas ocasiones la plagiocefalia posterior es causada por la fusión unilateral de la sutura lamboidea, pero es más frecuente que se relacione con fuerzas mecánicas anormales. La sinostosis compuesta, es decir, cuando 2 o más suturas están

fusionadas, puede causar una morfología craneal compleja, incluyendo la malformación de “Kleeblattschädel” (cráneo en trébol).⁵

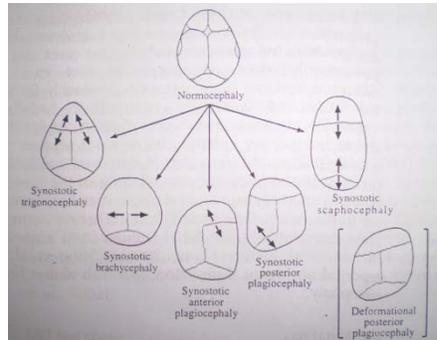


Fig. 2. Formas de cráneo. Tomado de Cohen y MacLean 2000.

Las craneosinostosis pueden ser aisladas o sindromáticas. Las primeras pueden clasificarse anatómicamente dependiendo de la sutura fusionada, mientras que las segundas se clasifican clínicamente en base a los hallazgos craneofaciales y a las suturas afectadas, las alteraciones en otros órganos y sistemas, y el patrón de herencia. Se conocen más de 100 síndromes con craneosinostosis.⁶

Los síndromes clásicos de craneosinostosis que son el objeto de estudio de este trabajo, se heredan en forma autosómica dominante (AD), e incluyen los síndromes de Apert (SA), Pfeiffer (SP), Saethre-Chotzen (SSC) y Crouzon (SC). Más adelante se describe con detalle cada uno de ellos.

La etiología de la craneosinostosis es heterogénea. Las craneosinostosis aisladas son de etiología multifactorial. Por su parte, en las craneosinostosis sindromáticas, se han identificado mutaciones genéticas en aproximadamente 20% de los casos. Los principales genes implicados son tres receptores de los factores de crecimiento de fibroblastos FGFR1, FGFR2 y FGFR3, y el factor de transcripción TWIST⁷.

A la fecha se han caracterizado diez diferentes FGFs, sus receptores (FGFRs) están codificados en cuatro genes parálogos en el humano, que se localizan en 8p11.2 (FGFR1), 10q26 (FGFR2), 4p16.3 (FGFR3) y 5q35.1-qter (FGFR4).



Fig. 3. Cromosoma 10 y locus del gen FGFR2. Tomado de Guizar-Vazquez 2001.

El gen FGFR2 está constituido por 4.5 kb, de las cuales 2.3kb codifican sus 19 exones. Se han caracterizado dos productos génicos alternativos: KGFR y BEK, esas dos isoformas son idénticas, excepto por las secuencia de 49 aminoácidos de la segunda mitad del dominio Ig III de la región extracelular del receptor. Esta diversidad se debe a la presencia de exones alternativos: el exón B que se expresa en BEK y el K26 que lo hace en KGFR. Se considera que el “splicing” alternativo es controlado por factores transactivadores⁸. En modelos murinos KGFR se expresa más en fibroblastos, mientras que BEK, en osteoblastos.

Los cuatro FGFRs tienen una estructura caracterizada por tres dominios extracelulares semejantes a inmunoglobulinas (IgI, IgII e IgIII), un segmento transmembranal y un dominio tirosincinasa (TK1/TK2).

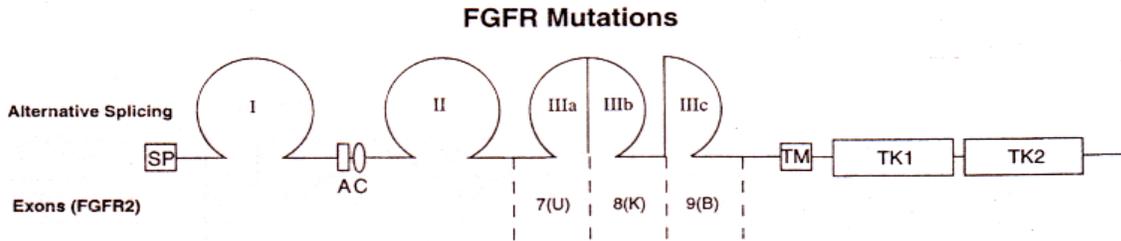


Fig. 4. Dominios del gen FGFR2 Tomado de Cohen MM 2000.

Los FGFRs son moléculas transductoras de señales que atraviesan la membrana celular, y la unión de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y de los proteoglicanos de heparán sulfato al dominio de unión a ligando (IgII e IgIII) promueve la dimerización de los FGFRs, originando la autofosforilación de la región tirosincinasa intracelular⁹.

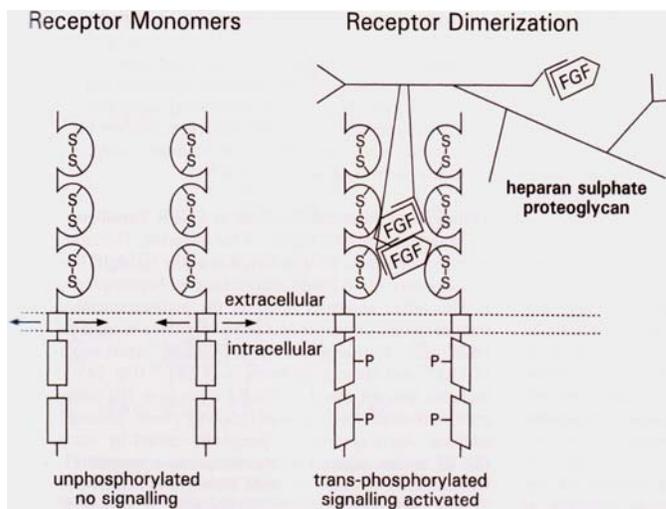


Fig. 5. Estructura de los FGFRs Tomado de Scriver CR et al, 2001.

La especificidad en la unión FGF-FGFR es regulada por la remoción y empalme de los exones IIIb y IIIc de los FGFRs. El FGF7 y FGF10 activan la isoforma b del FGFR2. Se ha propuesto además, que un cambio conformacional en la región de ligando de los FGFRs determina la especificidad de otros complejos FGF-FGFR ¹⁰.

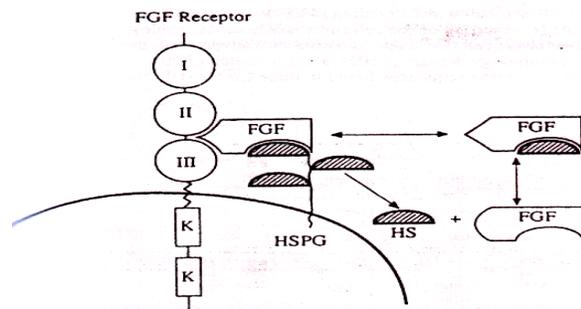


Fig.6 unión fgf y fgfr Tomado de Tolarova MM et al 1997

La mayoría de las mutaciones en los FGFRs son de sentido equivocado y todas confieren ganancia de función a la proteína, algunas mutaciones son altamente recurrentes. Los mecanismos de ganancia de función identificados en las mutaciones de FGFR2 son favorecidos por la afinidad de unión a los FGFRs altamente selectiva, la especificidad de unión a los FGFRs, la dimerización covalente independiente de FGFR y la expresión ectópica de formas alternativas de los FGFRs que confieren nuevas propiedades de unión a ligando; considerados mecanismos de herencia dominante de todos los fenotipos asociados.

Los FGFRs se expresan en diferentes tejidos y muestran una expresión compleja, dependiendo de la etapa del desarrollo, del tejido en el que se encuentre y de los

heterodímeros de los FGFRs. La vía de los FGFRs participa en una variedad de procesos celulares, incluyendo mitogénesis, apoptosis, diferenciación y migración.

Se sabe que FGFR1 y FGFR2 participan en la embriogénesis temprana, se ha demostrado que FGFR1 participa en la migración celular, mientras que FGFR2 participa en la inducción del desarrollo de extremidades.

Las mutaciones en FGFR2 se identificaron primero en el SC, después en otras craneosinostosis. En la actualidad mutaciones heterocigotas en FGFR1, FGFR2 y FGFR3 se han identificado en siete diferentes síndromes de craneosinostosis: SP, SA, SC, síndrome de Beare-Stevenson, síndrome de Muenke síndrome de Jackson-Weiss y síndrome de Antley-Bixler.

De acuerdo a los reportes publicados, el espectro de mutaciones de FGFR2, codificadas en 19 exones, es muy estrecho. De las distintas mutaciones identificadas, el 94 % se localizan en cada mitad del dominio IgIII: en el exón 8 (IIIa) y en el exón 10 (IIIc), que corresponde a los residuos de cisteína en la unión disulfuro (la mutación en el residuo Cys342 representa aproximadamente el 36% de las mutaciones en IgIII), o en el intrón que flanquea al exón 10. La remoción alternativa de intrones une al exon IIIa con el exon IIIb o en el exón IIIc, generando distintas isoformas del FGFR2 con diferentes propiedades de unión a los FGFs; así, las mutaciones del exon IIIc afectan solo la isoforma FGFR2c. Las mutaciones descritas fuera de esas regiones son mutaciones puntuales encontradas en un niño con SC, SBS y en craneosinostosis no sindromáticas

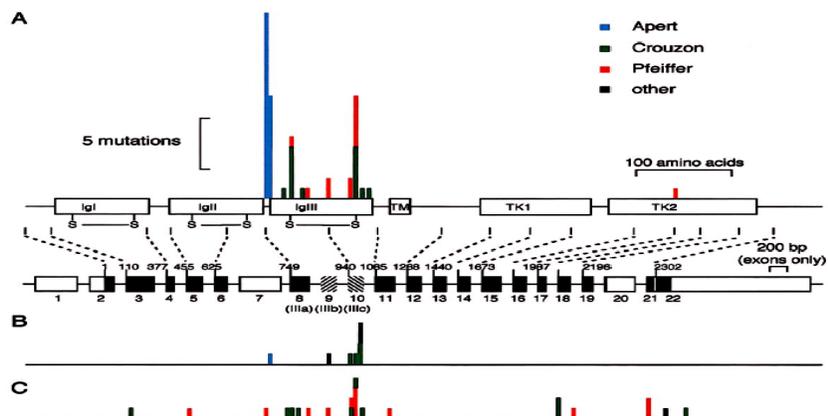


Fig. 7. Esquema de mutaciones. Tomado de Kan et al AM J Hum Gen 70;472-486 2002

El diagnóstico positivo de las craneosinostosis sindromáticas se basa en algunos elementos básicos como la presencia de cráneo morfológicamente anormal, la ausencia a la palpación de determinada fontanela, por su osificación anticipada y estudio radiológico simple que evidencia la sutura cerrada. El análisis de las mutaciones ayuda a definir la clasificación clínica de éstos síndromes, por el establecimiento de similitudes etiológicas de algunos padecimientos (por ejemplo, el SC y SP se deben a mutaciones de FGFR2), mientras que algunos fenotipos similares pueden deberse a mutaciones en diferentes genes. El análisis molecular también permite identificar los padres portadores levemente afectados, así como el diagnóstico prenatal.

El tratamiento de las craneosinostosis es eminentemente quirúrgico, consiste en la cirugía craneofacial y la corrección quirúrgica de alteraciones en manos y pies. Está indicado por la presencia de hipertensión endocraneana, atrofia del nervio óptico,

retraso del desarrollo psicomotor, con fines estéticos y para permitir un crecimiento del cerebro sin restricciones. Se requiere de un equipo multidisciplinario para el manejo de las anomalías craneofaciales, audiológicas, oculares, dentales, de extremidades y piel⁸.

A continuación se describen las craneosinostosis más frecuentes:

Síndrome de Apert

Se describió por primera vez en 1906, su prevalencia se estima en 1 en 65,000 a 80,000 recién nacidos y se caracteriza por turri-braquicefalia, frontal prominente, hipoplasia mediofacial, base de cráneo asimétrica, anomalías faciales (hipertelorismo, fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, exoftalmia, puente nasal deprimido, nariz picuda, alteraciones palatinas y dentales), pulgares anchos, primeros ortejos grandes, y sindactilia simétrica de manos y pies. También se ha encontrado déficit auditivo, alteraciones del sistema nervioso central y retraso mental de leve a moderado en algunos pacientes⁹.

El síndrome de Apert con paladar hendido refleja una alteración en el crecimiento de los huesos craneofaciales, sugiriendo que hay 2 subtipos de SA, uno con alteraciones faciales severas y sindactilia leve, y otro con sindactilia severa y problemas craneofaciales relativamente leves¹⁰

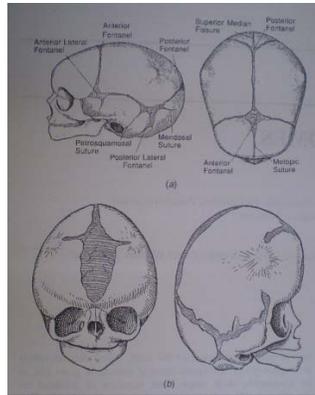


Fig.8. Cráneo en Síndrome de Apert Tomado de Silverman 1985

Aproximadamente el 98% de los casos son esporádicos. Las mutaciones de novo se correlacionan con edad paterna avanzada. La mayoría de los pacientes con SA tienen una de dos mutaciones heterocigotas específicas en el gen *FGFR2* (S252W o P253R). La correlación genotipo-fenotipo no presenta una diferencia convincente en la prevalencia de muchas malformaciones en el SA con las siguientes excepciones: El paladar hendido es más común en pacientes con la mutación S252W, mientras que la sindactilia de manos y pies es más severa en quienes tienen la mutación P253R¹¹.

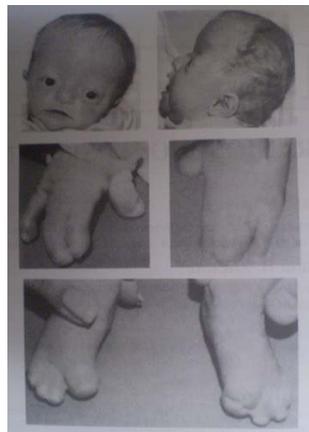


Fig. 9. Paciente con Síndrome de Apert Tomado de Oldridge et al 1997.
Síndrome de Beare-Stevenson

Fue descrito por primera vez en 1969, es una condición rara, esporádica con muerte temprana, con solo 9 casos publicados. Las características clínicas incluyen piel con arrugas o pliegues profundos (*cutis gyrata*) que afecta el cráneo, cara, cuello, tronco, manos y pies, y acantosis nigricans. La craniosinostosis es severa, y las alteraciones faciales descritas son hipertelorismo, puente nasal amplio, defectos auriculares, paladar hendido, hipodoncia, atresia de coanas, escroto bífido, eversión coccígea y anomalías anogenitales. Todos los casos son esporádicos, con edad paterna avanzada en algunos. Se han descrito las siguientes mutaciones heterocigotas en *FGFR2*: S372C y Y375C. En otros casos no se han encontrado mutaciones en *FGFR2*, lo que sugiere heterogeneidad genética¹².



Fig. 10 y 11 Paciente con Síndrome de Beare-Stevenson Tomado de Beare et al BrJ Dermatol 8;241



Fig. 12. Paciente con Síndrome de Beare-Stevenson Cohen Jr Am J Med Genet Suppl 4;99 1988

Síndrome de Crouzon

Se describió por primera vez en 1912. El SC se caracteriza por braquicefalia, escafocefalia y trigonocefalia, hipoplasia medifacial, hipoplasia maxilar, prognatismo relativo, hipertelorismo, estrabismo, exoftalmia, nistagmus, atrofia óptica, nariz prominente y picuda. Algunos hallazgos clínicos incluyen convulsiones, sordera, fusión cervical, agenesia del cuerpo calloso y siringomelia¹⁴. El SC tiene alta penetrancia y variabilidad moderada de las características clínicas. Aproximadamente la mitad de los casos son familiares y la otra mitad son mutaciones de novo con efecto de edad paterna. La prevalencia de este padecimiento es de 1 en 65,000 recién nacidos. Los estudios de ligamiento mapearon al SC en el cromosoma 10q5-q26 y se han identificado numerosas mutaciones heterocigotas en *FGFR2*¹⁵.

El SC con acantosis nigricans se debe una mutación heterocigota (A391E) en *FGFR3*, se presenta generalmente en mujeres, con alteraciones en la piel como hiperpigmentación, hiperqueratosis y nevos melanocíticos. La hiperplasia verrucosa se desarrolla en áreas de flexión, anomalías adicionales son atresia de coanas,

hidrocefalia, hipoplasia del foramen magno, escoliosis y estenosis espinal con parestesia de las extremidades inferiores¹⁶.

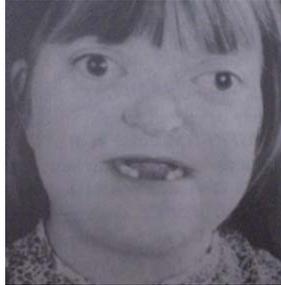


Fig. 13. Paciente Síndrome de Crouzon Tomado de Reardon et al 1994

Síndrome de Jackson-Weiss

Se hereda de forma AD, con alta penetrancia y expresión variable. Se reportó por primera vez en 1976 en una gran familia judía con 88 afectados. La craneosinostosis con hipoplasia medifacial, frontal prominente, sindactilia cutánea de los pies y desviación medial de los primeros orjejos, caracteriza al síndrome de Jackson-Weiss (SJW). Algunos pacientes no tienen anomalías craneofaciales. El fenotipo de SJW se sobrelapa con otros fenotipos asociados con mutaciones en FGFR2, lo que causa confusión¹⁷.



Fig. 14 y 15 Paciente con Síndrome de Jackson Weiss Tomado de Jackson et al J Pediatric 1976



Fig.16. Radiografía de manos Paciente con Síndrome de Jackson Weiss Tomado de Jackson et al J Pediatric 1976

Síndrome de Pfeiffer

Es una craneosinostosis de herencia AD, descrita en 1964 por primera vez, que se caracteriza por craneosinostosis, pulgares y primeros ortejos anchos. El SP tiene penetrancia completa y expresividad variable. Los casos con mutaciones nuevas tienen un fenotipo más severo. La prevalencia de este síndrome se desconoce, pero es menos frecuente que el SA, SC, SM y SSC. Existen subtipos clínicos en el SP: el SP clásico o tipo 1, tiene mejor pronóstico y es compatible con una expectativa normal de vida e inteligencia normal, en la mayoría de los casos. En contraste el SP tipo 2 y 3, tiene un riesgo alto de problemas neurológicos y una esperanza de vida reducida, ambos tipos son esporádicos y más severos, incluyendo proptosis ocular severa y anquilosis de codo. En el tipo 2 hay cráneo en trébol.

Estudios de ligamiento en familias con SP demostraron heterogeneidad genética, con loci en 8p 11.2 y 10 q25-q26, con mutaciones en los genes del FGFR1 y FGFR2,

respectivamente. En el SP tipo 1 se han reportado mutaciones en FGFR1 y FGFR2, mientras que los pacientes con SPO tipo 2 y 3, sólo en FGFR2. En muchos casos esporádicos se ha identificado la mutación P252R en el FGFR1, sin embargo el fenotipo es muy variable.

Las características craneofaciales en el SP son variables y secundarias a la sinostosis coronal; e incluyen cráneo braquiturricéfálico, hipoplasia mediofacial con prognatismo relativo, nariz en pico, puente nasal bajo, hipertelorismo, fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, exoftalmia, nistagmo, paladar alto y dientes amontonados. En algunos casos puede presentarse retraso mental, dilatación ventricular, hidrocefalia, malformación de Arnold-Chiari, convulsiones, fusión vertebral, eversión sacrococcígea, cubitus valgus, sinostosis de la articulación radiohumeral y escapulohumeral, húmero corto, coxa valga, pie equinvaro, sordera, hipoplasia del nervio óptico, coloboma de iris, atresia de coanas, úvula bífida, estenosis traqueal, dientes supernumerarios, hipertrofia gingival, malrotación intestinal, atresia anal, estenosis pilórica, hernia umbilical, criptorquidia y escroto bífido. De manera particular los pacientes con SP tienen pulgares y primer ortejo ancho, braquidactilia, sindactilia cutánea de manos y pies.



Fig. 17. Paciente Síndrome de Pfeiffer Tomado de Schell et al 1995

Radiológicamente se encuentran falanges fusionadas, braquimesofalangia del 2° y 5° dedos, sinfalangismo y ocasionalmente fusión de los extremos proximales del 4° y 5° metacarpianos, falange distal del 1°. Ortejo ancha y malformada, 1er metatarso ancho y corto, y fusión de los huesos del carpo y tarso¹⁹.

ENFERMEDAD	GEN	LOCUS	HERENCIA	SUTURA	CUADRO CLINICO
Apert	FGFR2	10q26	AD	Coronal.	Sindactilia cutánea y ósea, retraso mental variable, frente alta, occipucio aplanado, nariz pequeña, fusión vertebral, estenosis pilórica, alteraciones renales,
Crouzon	FGFR2 FGFR3	10q26	AD	Coronal, Sagital, lamboidea.	Proptosis ocular, hipoplasia de órbitas, estrabismo, hipertelorismo, prominencia frontal, hipoplasia medifacial,

					nariz en pico de loro, paladar estrecho, prognatismo, alteraciones dentales, sordera.
Pfeifer	FGFR2	10q26	AD	Coronal. Sagital en ocasiones	Craneosinostosis, hipertelorismo, órbitas prominentes, braquidactilia, hipoplasia medio-facial, alteraciones en columna, anquilosis de codos, rodillas, alteraciones traqueales y laringeas.
Jackson Weiss	FGFR2	10q26	AD		Prognatismo, dedos anchos en pies, metatarso corto, anomalías en tarso.
Beare Stevenson	FGFR2	10q26	AD		Retraso mental, hipoplasia medio-facial, pabellones auriculares displásicos, cutis gyrata, pezones accesorios, hernia umbilical.

Tabla 2. Características Generales de Craneosinostosis

Objetivo General:

Identificar las mutaciones en los exones 8 y 10 del gen FGFR2 en pacientes que han sido diagnosticados con los síndromes de Apert, Pfeiffer, y Crouzon, y en pacientes con diagnóstico dudoso, así como determinar si existe alguna relación entre las mutaciones encontradas y el cuadro clínico de los pacientes.

Objetivos Específicos:

1. Identificar las mutaciones en los pacientes con craneosinostosis sindromática (Síndrome de Apert, Pfeiffer, Crouzon, Beare Stevenson y Jackson Weiss).
2. Pacientes sin diagnóstico definitivo.
3. Determinar si existe relación entre la mutación y el cuadro clínico de los pacientes.

Justificación.

Se estudiará el gen FGFR2, específicamente los exones 8 y 10, debido a que la mayoría de los pacientes con craneosinostosis, atendidos en la consulta externa del servicio de Genética Médica del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, tienen diagnóstico de Síndrome de Apert, Pfeiffer, Beare Stevenson, Jackson Weiss y Crouzon, que son los síndromes que se han asociado a mutaciones en este gen.

Este estudio podremos determinar las relaciones existentes entre el fenotipo y genotipo de las diferentes craneosinostosis y poder brindar el diagnóstico a los pacientes en los cuales el fenotipo no permite incluirlos en una categoría determinada de acuerdo al genotipo. Así mismo, se podrá determinar de manera temprana el diagnóstico determinado de los pacientes, y con ayuda del servicio de Cirugía Plástica y la Clínica de Cirugía Craneofacial brindar un tratamiento específico para cada paciente y evitar complicaciones posteriores como alteraciones faciales y retraso mental entre otras, lo que le permitiría al ISSSTE reducir costos en cuanto a diagnóstico y tratamiento, de acuerdo a una atención temprana. Otra posibilidad en el futuro sería realizar diagnóstico prenatal y/o de portadores, como un trabajo asistencial a los derechohabientes del Instituto.

Diseño del estudio:

<p>Diseño</p> <p>Forma previamente definida, en la que los elementos serán sujetos a las condiciones establecidas en el estudio.</p> <p>De acuerdo a Campbell y Stanley, el diseño del estudio será con un sólo grupo en el se establecerá la relación entre variable independiente y la dependiente.</p> <p><i>6.1. Tipo de Investigación</i></p>			
6.1.1. Observacional	(X)	Experimental	()
6.1.2. Longitudinal	()	Transversal	(X)
6.1.3. Prospectiva	(X)	Retrospectiva	()

MATERIALES Y METODOS:

El estudio incluyó 13 pacientes con diagnóstico clínico-radiológico de síndrome de Apert, Crouzon, Pfeifer tipo 2 y 3, Jackson-Weiss o Beare- Stevenson realizado por el servicio de la consulta externa de Genética Médica y la Clínica de Malformaciones craneofaciales del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE. A cada uno de los pacientes seleccionados se le tomó una muestra de 5ml de sangre periférica, previo consentimiento informado. Se realizó además una hoja de recolección de datos e historia clínica completa. Para la extracción de DNA se utilizó un método salino con los parámetros ya establecidos en el laboratorio de Medicina Genómica, cuyo procedimiento se basa principalmente en la lisis de los eritrocitos con la solución de lisis celular, seguido por la lisis de los leucocitos y su núcleo con la solución de lisis nuclear, después las proteínas celulares fueron removidas mediante precipitación salina y, por último el ADN genómico es concentrado y desalinizado por medio de una precipitación alcohólica con isopropanol.

Posteriormente se realizó análisis cualitativo del DNA extraído, mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio en solución amortiguadora TAE 1X. En cada corrimiento se agregó un marcador de peso molecular de 100 pb.

Se observó la integridad del DNA por exposición de los geles a la luz ultravioleta.



Fig.18 Corrimiento electroforético de DNA.

Se realizó estandarización de PCR (Polimerasa Chain Reaction) para los exones 8 y 10 del gen FGFR2, posteriormente se realizó corrimiento electroforético.

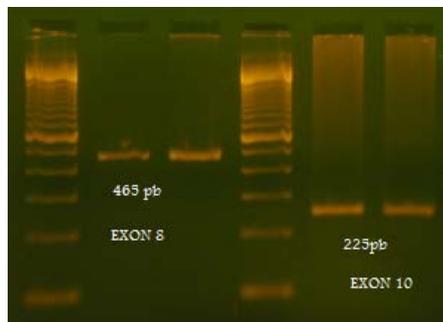


Fig. 19. Fragmentos correspondientes a los exones 8 y 10.

Se cortaron y purificaron las bandas de los productos amplificados, para realizar PCR de secuenciación y posteriormente se secuenciaron dichos exones.

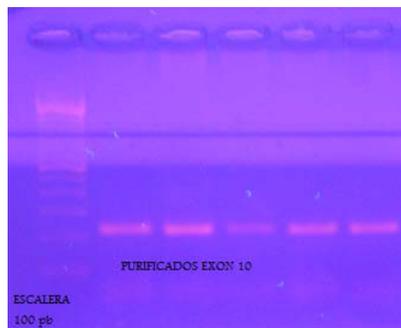


Fig. 20. Bandas que indican los purificados del exón 10.

Para la amplificación de la región codificante de los exones 8 y 10 por PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (21):

Exón	Primer	Secuencia 5'-3'	tamaño del fragmento
8	FGFR2 IIIaF3	GGCCACAGTGTTATTTCAA	465 pb
	FGFR2 IIIaR3	CTCTCTGCTGGCTAGTCAA	
10	FGFR2 IIIcF	CACAATCATTCTGTGTCGT	225 pb
	FGFR2 IIIcR	CCCAGAGAGAAAGAACAGTA	

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Agua estéril libre de nucleasas	8.1	
Amortiguador	1.25	1x
Enzima Taq Pol	0.15	1.5u/µl
DNTPs	0.5	0.4mM
IIIaF3 / IIIcF	0.5	0.4µM
IIIaR3 / IIIcR	0.5	0.4µM
DNA genómico	1.0	50 ng/ul
Volumen total	12.5 µl	

Tabla 3. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados para la amplificación por PCR de los exones 8 y 10 del gen FGFR2

CONDICION	TIEMPO	TEMPERATURA
Pre calentamiento	2 min.	95°C
Desnaturalización	30 seg	95°C
Alineamiento	30 seg	56°C
Elongación	30 seg	72°C
35 CICLOS		
Extensión final	5 min.	72°C

Tabla 4. Condiciones del termociclador para realizar PCR de los exones 8 y 10 del gen FGFR2.

Costo de la investigación:

Este estudio fue realizado con recursos propios del grupo de trabajo.

DESCRIPCION DE LOS PACIENTES:

Paciente 1. AGEM Paciente femenino de 3 años, valorada por primera vez a los 7 meses de edad, con perímetro cefálico de 44 cm, turricefalia, frente amplia, hipertelorismo, puente nasal deprimido, nariz con punta hacia abajo, paladar alto, no ojival, cuello corto, pectum excavatum, en abdomen se observa sonda de derivación ventrículo-peritoneal por hidrocefalia.

TAC de cráneo 3D demostró cierre de suturas coronales.

Valorada nuevamente a los 2 años de edad, con cambios en el fenotipo: hipoplasia de orbitas, proptosis, hipoplasia medifacial.

Otros: Retraso global del neurodesarrollo, crisis convulsivas tónico-clónicas, PO piloroplastia por estenosis pilórica. Resonancia Magnética demuestra agenesia de cuerpo caloso, atrofia corticosubcortical.

Diagnóstico Síndrome de Crouzon



Fig.21. Paciente 1. A los 7 meses de edad.

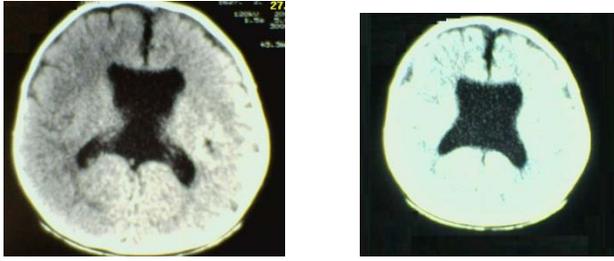


Fig. 22 y 23. Estudios de Imagen que demuestran la atrofia cortico-subcortical y agenesia de cuerpo calloso.



Fig. 24. Paciente 1 a los 3 años.

Paciente 2. TAL Paciente masculino de 2 años 4 meses de edad, valorado por primera vez a los 6 meses, cráneo con plagiocefalia, perímetro cefálico de 46 cm, proptosis. A los 9 meses observaron cambios en el fenotipo: cráneo en trébol, hipoplasia de tercio medio facial, hipoplasia mandibular, se detectó la presencia de hipospadias y acidosis tubular renal. Presenta retraso psicomotor.

TAC de cráneo 3D demostró cierre de sutura metópica y sutura coronal derecha.

Diagnóstico Síndrome de Crouzón.

Paciente 3. NRJE Paciente masculino de 1 año 7 meses, valorado por primera vez a los 7 meses, cráneo con escafocefalia, perímetro cefálico de 45 cm, frontal abombado y prominente, telecanto, nariz pequeña, paladar hendido, implantación baja de pabellones auriculares sindactilia ósea y cutánea de manos y pies de ortejos 3 – 5. Presenta retraso global del neurodesarrollo.

TAC de cráneo 3D demostró cierre de suturas coronales.

Diagnóstico Síndrome de Apert.

Paciente 4. GPJP Paciente masculino de 9 años valorado por primera vez a los 7 años, cráneo con plagiocefalia, telecanto, estrabismo, apiñamiento dental, cuello corto, braquidactilia. Desarrollo psicomotor normal.

TAC de cráneo 3D demostró sinostosis coronal y sagital.

Otros: hemivertebra cervicales.

Diagnóstico Craneosinostosis sindromática a determinar

Paciente 5. CMM Paciente masculino de 1 año 6 meses de edad, valorado por primera vez a los 4 meses de edad cráneo con braquicefalia, perímetro cefálico de 44cm, hipoplasia orbitaria, hipoplasia maxilar, nariz en pico de loro, abdomen con presencia de sonda de derivación ventrículo-peritoneal, criptorquidia bilateral.

TAC de cráneo 3D demostró sinostosis coronal de predominio derecho.

Otros: hipoplasia de cuerpo calloso, aumento de tamaño del 3er ventrículo, hipotonía, desarrollo psicomotor normal, motor fino retrasado para la edad.

Diagnóstico Síndrome de Crouzon.

Paciente 6. MVDA Paciente femenino de 3 años 6 meses, cráneo con plagiocefalia, hipertelorismo, puente nasal ancho, epicanto, pabellones de implantación baja, cavidad oral sin alteraciones, tórax con pectum excavatum, sindactilia cutánea de pies. Retraso psicomotor moderado.

Diagnóstico Síndrome de Apert

Paciente 7. MCRN Paciente masculino de 8 meses de edad, valorado por primera vez a los 3 días de vida, cráneo con braquicefalia, perímetro cefálico de 43cm, hueso frontal prominente, puente nasal aplanado, fisuras palpebrales oblicuas, hipoplasia de órbitas, nariz bulbosa, con punta hacia abajo, cavidad oral con paladar alto y estrecho, cuello corto, pabellones auriculares de implantación baja y rotados hacia atrás, pectum excavatum, braquidactilia.

Valorado nuevamente a los 3 meses, se realizó remodelación de cráneo a los 6 meses, desarrollo psicomotor adecuado para la edad.

Diagnóstico Síndrome de Crouzon.



Fig. 25 y 26. Paciente 7 a los 30 días de vida.

Paciente 8. GGCS Paciente masculino de 1 año 2 meses de edad, valorado por primera vez a los 6 meses de edad, cráneo con plagiocefalia, pabellones de implantación baja, hipoplasia de órbitas e hipoplasia medifacial. Desarrollo psicomotor normal.

TAC 3D demostró cierre de suturas coronales y metódica, valorado nuevamente al año de edad observando trigonocefalia, sin cambios en el resto del fenotipo.

Sin diagnóstico sindromático.

Paciente 9. GBG Paciente femenino de 5 años de edad, valorado por primera vez a los 11 meses de edad, cráneo con plagiocefalia, pabellones de implantación baja, hipoplasia de órbitas e hipoplasia medifacial. Desarrollo psicomotor normal.

TAC 3D demostró cierre de suturas coronales y metódica.

Dx Sd. de Crouzon atípico

Paciente 10. FRJ Paciente femenino de 5 meses de edad, valorada por primera vez a los 3 meses de edad, cráneo con braquicefalia, frente amplia, hipoplasia de orbitas, hipoplasia medifacial, telecanto, pabellones auriculares de implantación baja, nariz con punta hacia abajo, paladar hendido, micrognatia, cuello corto, pectum excavatum.

Desarrollo psicomotor adecuado para la edad.

Diagnóstico: Síndrome de Crouzon atípico



Figuras 27 y 28. Paciente 10. De 5 meses de edad.

Paciente 11.CHA Paciente femenino de 13 años de edad, cráneo con plagiocefalia, hipertelorismo, pabellones auriculares de implantación baja, sindactilia cutánea de manos y pies. Desarrollo psicomotor normal.

Diagnóstico: Síndrome de Apert

Paciente 12. PHJJ paciente masculino de 6 años de edad, cráneo con plagiocefalia, asimetría facial, hipertelorismo, estrabismo, braquidactilia, con pulgares anchos de ambas manos.

Otros: Crisis convulsivas de difícil control, retraso global del neurodesarrollo con predominio del área del lenguaje.

Diagnóstico: Síndrome de Jackson Weiss

Paciente 13. ZTMA Paciente masculino de 2 años 3 meses de edad, cráneo con plagiocefalia, con hipoacusia derecha, sindactilia cutánea de manos y pies, criptorquidia bilateral.

Retraso en el área del lenguaje.

Diagnóstico: Síndrome de Apert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Retraso Mental	X	X	X			X						X	
Plagiocefalia		X		X	X	X		X	X		X	X	X
Escafocefalia			X										
Turricefalia	X												
Braquicefalia.										X			
Asimetría facial.												X	
Hipoplasia de órbitas	X	X			X			X	X	X			
Hipertelorismo	X					X					X	X	
Proptosis	X	X			X		X			X			
Estrabismo				X								X	
Prominencia frontal.			X				X						
Hipoplasia mediofacial	X	X			X		X	X	X	X			
Nariz en pico de loro.	X				X		X			X			
Nariz pequeña			X										
Paladar estrecho	X						X						
Paladar hendido			X							X			
Micrognatia							X			X			
Alteraciones dentales.													
Pabellones auriculares bajos.			X			X	X	X		X	X		
Cuello corto	X			X			X			X			
Pectum excavatum	X					X				X			
Sordera.													X
Braquidactilia.				X			X					X	
Sindactilia cutánea de manos.			X								X		X
Sindactilia cutánea de pies			X			X					X	X	X
Sindactilia ósea			X										
Dedos anchos												X	
Metatarso corto			X										
Alteraciones en columna				X									
Estenosis pilórica	X												
Alteraciones renales.		X											
criptorquidia					X								X

Tabla 5. Características fenotípicas de los pacientes incluidos en el estudio.

RESULTADOS:

La secuenciación del exón 8 del gen FGFR2, en los pacientes 1, 3 y 5 mostró:

Un cambio de base de Adenina por Citosina en la posición 5187 del DNA genómico, que corresponde a la posición 1419 del DNA codificante, y al aminoácido 474 Leucina por Isoleucina. La mutación es de tipo conservadora, no polar, neutra.

Pacientes 1, 3 y 5 exón 8:

Un cambio de base de Adenina por Citosina en la posición 51213 del DNA genómico, que corresponde a la posición 1445 del DNA codificante, y al aminoácido 4781 Leucina por Isoleucina. La mutación es de tipo conservadora, no polar, neutra.

Pacientes 1 y 5, exón 8:

Un cambio de base de Adenina por Citosina en la posición 51272 del DNA genómico, que corresponde a la posición 1504 del DNA codificante, y al aminoácido 501 Prolina por Histidina. La mutación es de tipo no conservadora, no polar, neutra básica.

Paciente 10:

Utilizando la técnica de bandas G se analizaron 30 metafases, con un nivel de 400-450 bandas, el cual reportó una delección en el brazo largo del cromosoma 9 en la banda q22-q32. Cariotipo 46, xx, del (9)(q22-q32).

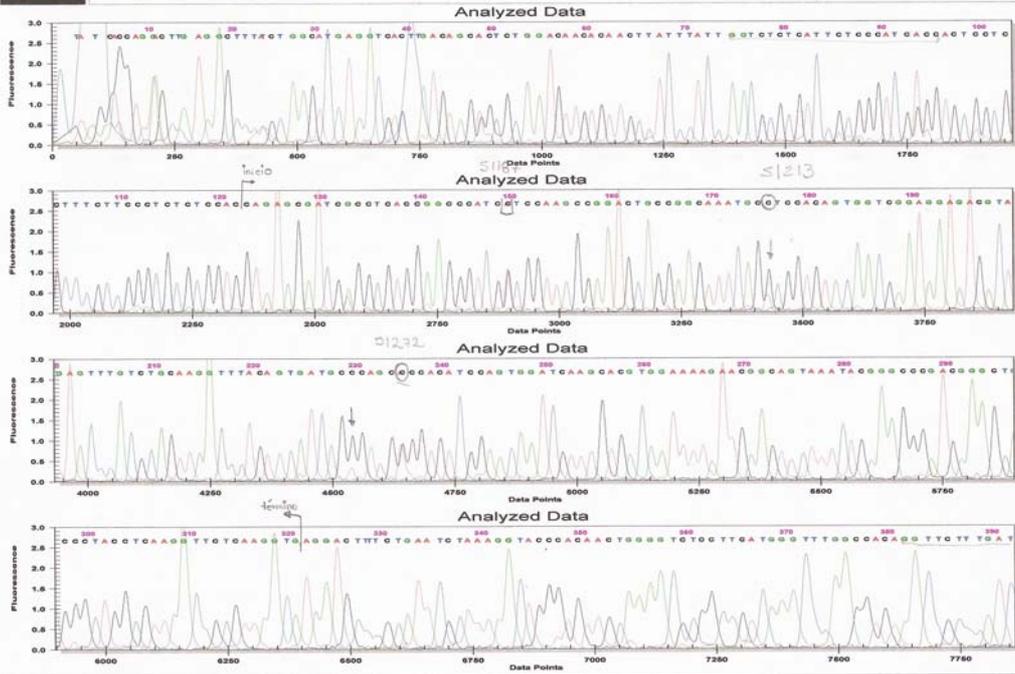
PACIENTE	DIAGNOSTICO	EXON 8	EXON 10
1	Síndrome de Crouzon clásico.	3 CAMBIOS	NORMAL
2	Síndrome de Crouzon atípico.	NORMAL	NORMAL
3	Síndrome de Apert clásico.	2 CAMBIOS	NORMAL
4	Craneosinostosis a determinar.	NORMAL	NORMAL
5	Síndrome de Crouzon clásico.	3 CAMBIOS	NORMAL
6	Síndrome de Apert atípico.	NORMAL	NORMAL
7	Síndrome de Crouzon clásico.	NORMAL	NORMAL
8	Craneosinostosis a determinar.	NORMAL	NORMAL
9	Síndrome de Crouzon atípico.	NORMAL	NORMAL
10	Síndrome de Crouzon atípico.	NORMAL	NORMAL
11	Síndrome de Apert atípico.	NORMAL	NORMAL
12	Síndrome de Jackson Weiss	NORMAL	NORMAL
13	Síndrome de Apert típico	NORMAL	NORMAL



Project : Default
 Sample : 3.C02_08091112L1
 Result : Untitled

System : System 1

Operator : Manual analysis
 Instrument : System 1 (Ver. 9.0.25)



Thu 09/11/08 14:28:51

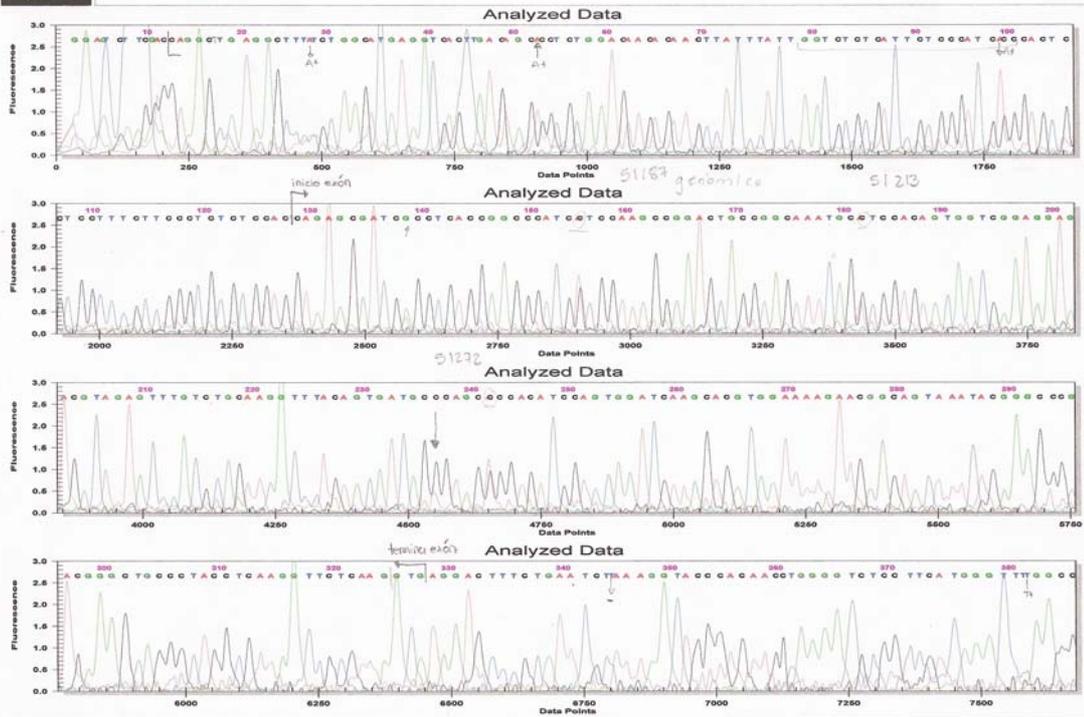
Page: 2



Project : Default
 Sample : 1.A02_08091112L1
 Result : Untitled

System : System 1

Operator : Manual analysis
 Instrument : System 1 (Ver. 9.0.25)



Thu 09/11/08 14:26:52

Page: 2



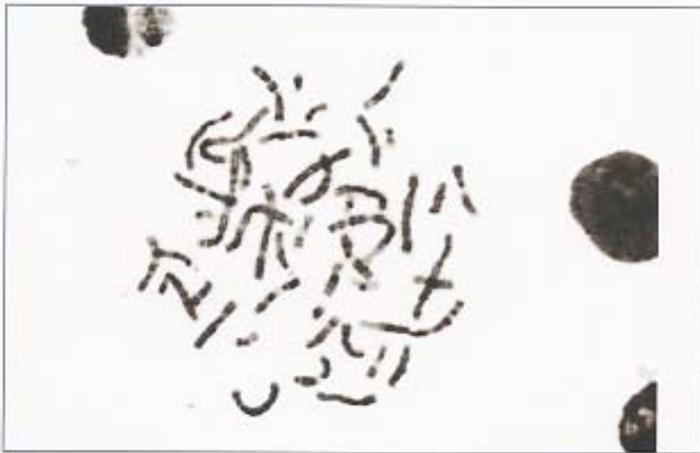
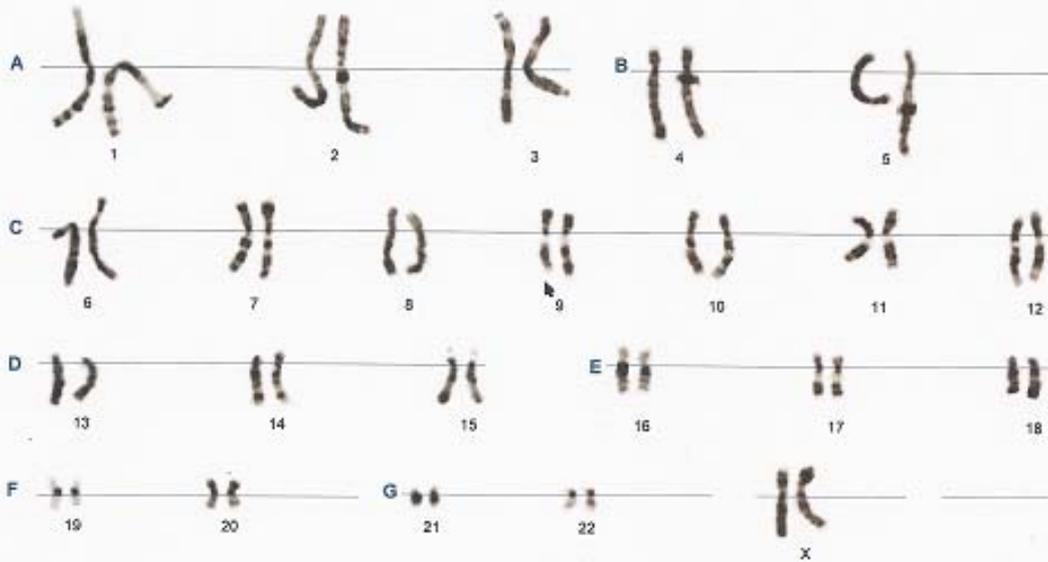
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
LABORATORIO DE GENETICA



ESTUDIO #: SP337-08

FECHA: 31/12/2008

NOMBRE DEL PACIENTE: F R J



TIPO DE MUESTRA:
SANGRE PERIFERICA

CARIOTIPO:
46,XX,del (9)(q22q32)

Av. Félix Cuevas #540, Col. del Valle, C.P. 03100, Mexico D.F.

Figura 29. Cariotipo paciente 10.

DISCUSION:

Se ha establecido por una parte que, las mutaciones en el *FGFR2* asociadas con craneosinostosis se encuentran en elementos estructurales del receptor, y modifican su función por diferentes mecanismos como: una dimerización alterada, formación de una proteína trunca, desintegración del dominio IgIII y cambios en el sitio de unión a ligando (Steinberg 98).

Por otra parte se sabe que la mayoría de las mutaciones en *FGFR2* que causan los síndromes de craneosinostosis se encuentran dentro de un "hot spot", constituido por el exón 8 (dominio IIIa), exón 10 (dominio IIIc) y por la secuencia intrónica que precede al exón 10. Es por ello que en esta serie de casos con craneosinostosis sindrómicas, se analizó la secuencia genética del exón 8, el intrón 9 y el exón 10.

En los pacientes 1 y 5, se encontraron las mismas mutaciones en el exón 8, ambos se encuentran diagnosticados con Síndrome de Crouzon típico por lo esperábamos encontrar de acuerdo a lo descrito mutaciones en el exón 8 ó en el 10. Llama la atención la presencia de 3 mutaciones en la secuencia del exón 8, como se ha reportado en algunos casos de Síndrome de Apert, atribuyéndose estos cambios al efecto de edad paterna.

En los casos de pacientes con Síndrome de Crouzon atípico (paciente 2, 9 y 10) no encontramos cambio en las secuencias que codifican para el dominio IgIII, lo que apoya los estudios en donde en el 80% de los pacientes con Síndrome de Crouzon

las mutaciones se encuentran en el FGFR2, el 20% restante se puede encontrar en otras partes del gen.

Con relación al Síndrome de Apert el 65% de los casos se deben al cambio 934C-G que caracteriza al síndrome con alteraciones craneofaciales más severas incluyendo paladar hendido y, en el 34% de los pacientes se encuentra la mutación 937C-G que se asocia con severas alteraciones de las extremidades (Park 1995, Wilkie 1996). El análisis de los pacientes 3,6, 11 y 13 se reportó sin alteraciones tanto en el exón 8 como en el 10, sin la posibilidad de evaluar la secuencia correspondiente a la unión del dominio IgII e IgIII donde se encuentran la mayoría de las mutaciones.

Cabe mencionar que 2 de los pacientes con diagnóstico de Síndrome de Apert presentan características atípicas por lo que podemos considerarlos como Cefalodactilia de Vogt (Enfermedad Apert –Crouzon)²² de los cuales ahora se sabe que las mutaciones se encuentran en cualquier región del gen.

Estudiamos un paciente con la sospecha diagnóstica de Síndrome de Jackson – Weiss en quien la secuencia de los exones 8 y 10 fue normal y en el intrón 10 encontramos un cambio de Adenina por Timina en la posición 54040. Es posible que este cambio únicamente represente un polimorfismo, ya que se encuentra en una región no codificante del gen, y no produce un corrimiento en el marco de lectura

Estudios recientes demuestran que en pacientes con escafocefalia o con fusión aislada de las suturas metódica y sagital se encuentran mutaciones en el “hot spot” del gen, por lo cual se incluyeron pacientes con estas características acompañados

de otros datos clínicos y no se encontraron mutaciones, lo que nos indica la posible participación de otros genes en la etiopatogenia²³.

Las investigaciones realizadas respecto a craneosinostosis relacionadas a mutaciones del gen FGFR2 se encuentran dentro de un gran espectro, aunque posee un genuino “hot spot”.

En el caso del paciente 10 encontramos la presencia de una alteración cromosómica de tipo estructural que corresponde a una deleción del brazo corto del cromosoma 9 en la región q22-q32. Esta deleción se encuentra descrita con un cuadro clínico muy característico que concuerda con los datos encontrados en la paciente, en la que es posible observar braquicefalia, frente amplia, hipoplasia de órbitas, hipoplasia mediofacial, telecanto, pabellones auriculares de implantación baja, nariz con punta hacia abajo, paladar hendido, micrognatia, cuello corto y pectum excavatum. Hay que hacer notar que solo el 40% de los pacientes descritos como portadores presentan craneosinostosis que puede llegar a confundirse con algunas otras craneosinostosis sindromáticas²⁴.

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a _____

Yo _____ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO para participar en el estudio titulado:

"Análisis de mutaciones en el gen *FGFR2* en pacientes con craneosinostosis sindrómicas". Registrado ante la Coordinación de Investigación en Salud del CMN "20 de Noviembre" con el número 02/08

El objetivo de estudio es correlacionar las diferentes mutaciones en el gen *FGFR2* con el fenotipo de los síndromes de Apert, Crouzon, Pfeifer tipo 2 y 3, Jackson-Weiss o Beare-Stevenson en pacientes mexicanos. Se llevará a cabo en este Centro Médico por los servicios de Cirugía Plástica, Genética y Medicina Genómica, en un período de 2 años.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

1. Responder de forma verbal un cuestionario aplicado por el médico
2. La realización de estudios de gabinete, en caso necesario
3. Autorizar la obtención de una muestra sanguínea de 5 ml

DECLARO QUE SE ME HA INFORMADO AMPLIAMENTE SOBRE LOS POSIBLES RIESGOS, INCONVENIENTES Y MOLESTIAS. ENTIENDO QUE EL OBJETIVO DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ES MEJORAR LA ATENCIÓN MÉDICA Y NO NECESARIAMENTE INVOLUCRA UN BENEFICIO EN PARTICULAR PARA MI o PARA MI FAMILIAR.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de participar en el estudio, así como de retirarme en el momento que lo decida, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado la seguridad de que no se me identificará plenamente en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial y anónima.

El DNA obtenido de la muestra sanguínea se guardará en el Laboratorio de Medicina Genómica de este Centro Médico, bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados al proyecto de investigación por un período de 10 años, ya que podría ser utilizado en otras investigaciones relacionadas con las

COMITÉ DE ÉTICA
20 DE NOVIEMBRE



craneosinostosis y debido a que la muestra será llevada al anonimato será imposible destruirla a pesar de su petición.

NOMBRE Y FIRMA DE CONFORMIDAD DEL PACIENTE O DEL
REPRESENTANTE LEGAL
O AMBOS PADRES O TUTORES DEL PACIENTE

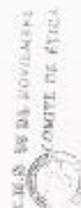
TESTIGO

TESTIGO

NOMBRE, FIRMA Y MATRICULA DEL INVESTIGADOR

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar con la Dra. María del Carmen Chima G. / Dra. Yuritzí Santillán Hernández en el siguiente número telefónico: (55) 52-00-50-03, extensión 14605 y 14645.

Si usted quisiera discutir su participación con una persona que no este directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar a la Coordinación de Investigación del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE al teléfono: (55)52-00-50-03, ext. 14609.



Bibliografia:

1. Lajeunie E, Et al: Genetic study of craniosynostosis, Am J Med Genet 55:500, 1995.
2. O'Brien, M, Kex, DB: Review of clinical neurosurgical practical, Surgical management of craniosynostosis, Contemporary Neurosurg. 740: 1-5, 1985.
3. Parker WJ, et al: ... Am J Hum Genet 57: 321-328, 1995
4. Brash, J.C.: Cunningham's Text-book of Anatomy. Edition 9. London. 1951. pp; 806-824.
5. Chumas PD, et al: Classification of previously unclassified cases of craniosynostosis, J Neurosurg 86: 177, 1997.
6. Cohen MM, MacLean RE: Craniosynostosis: Diagnosis, evaluation and management. New York, Oxford University Press, 2000.
7. Kan S, et al: Genomic Screening of Fibroblast Growth-Factor Receptor 2 Reveals a Wide Spectrum of Mutations in Patients with Syndromic Craniosynostosis, Am J Hum Genet 70: 472-486, 2002.
8. Scriver CR, et al: The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, Craniosynostosis syndromes. McGraw-Hill Medical Publishing, 8a ed, New York McGraw-Hill, Vol IV, pp. 6129, 2001.
9. Tolarova MM, et al: Birth prevalence, mutation rate, sex ratio, parent's age, and ethnicity in Apert syndrome, Am J Med Genet 72: 394, 1997.

10. Slaney SF, et al: Differential effects of FGFR2 mutations on syndactylia and cleft palate in Apert syndrome, *Am J Med Genet* 58: 923, 1996.
11. Wilkie AO, et al: Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome, *Nat Genet* 9: 165, 1995.
12. Przylepa KA, et al: fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome, *Nat Genet* 13: 492, 1996.
13. Jabs EW, et al: A mutation in the home domain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75: 443, 1993
14. Gorlin RJ, et al: Syndromes of the head and neck. Oxford Monographs on Medical Genetics, 4th ed. New York, Oxford University Press, 2000.
15. Gorlin RJ: Fibroblast growth factors, their receptors and receptor disorders. *J Craniomaxillofac Surg* 25: 69, 1997.
16. Superti-Furga A, et al: Crouzon syndrome with acanthosis nigricans, spinal stenosis and desmo-osteoblastomas: pleiotropic effects of the FGFR3 Ala 391Glu mutation *J Craniomaxillofac Surg* 24: 112, 1996.
17. Ades LC, et al: Jackson-Weiss syndrome: Clinical and radiological findings in a large kindred and exclusion of the gene from 7p21 and 5qter, *Am J Med Genet* 51:121, 1994.
18. Muenke M, et al: A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome, *Am J Hum Genet* 60: 555, 1997.
19. Moore MH, et al: Pfeiffer syndrome: a clinical review, *Craniofac J* 32: 62, 1995.

20. El Ghouzzi V, et al: Mutations of the *TWIST* gene in the Sathre-Chotzen syndrome, *Nat Genet* 15: 42, 1997.
21. Vogt et al. Apert- Crouzon Disease 1933. Mc Gillivray, R Savarirayan TC Cox, C Stojkoski, R Mc Neil, A Bankier, JF Bateman T Roscioli *JMG* 2005.
22. G. Shasidhar Pai et al. *Handbook of Chromosomal Syndromes* Willey 2003.