

11216

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
**ANALISIS MOLECULAR DEL GEN CBFA1 EN  
PACIENTES CON DISPLASIA CLEIDOCRANEAL.**

SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
ORGANISMO DESCENTRALIZADO  
**TESIS DE POSTGRADO**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO GENETISTA**



**R E S E N T A :**  
**LAURA ELENA MACHUCA TZILI**

DIRECCION DE ENSEÑANZA

TUTOR: SUSANA KOFMAN-ALFARO

ASESOR TECNICO: NANCY MONROY JARAMILLO



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todo el personal del Departamento de Genética del Hospital General de México.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A mi esposo.

## INDICE

	Página
1. RESUMEN	2
2. ANTECEDENTES	4
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	34
5. PACIENTES Y METODOS	35
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSIÓN	46
8. ANEXOS	
Anexo 1: Carta de Consentimiento	51
Anexo 2: Bases de Datos Electrónicas	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

## RESUMEN

La Displasia Cleidocraneal (DCC), es un padecimiento que presenta un patrón de herencia autosómico dominante, cuyo fenotipo abarca un amplio espectro que va desde cuadros clínicos clásicos, hasta casos leves que presentan dientes neonatales o supernumerarios como única manifestación. Sus principales características clínicas consisten en estatura baja proporcionada, ausencia o hipoplasia de clavículas, anomalías craneales como fontanelas amplias o persistentes y abombamiento frontal, defectos dentales como caries, dientes neonatales o supernumerarios y retraso en la erupción de dientes deciduales o permanentes, así como otros defectos esqueléticos que traducen una falla tanto en la osificación intramembranosa como endocondral.

Recientemente se ha determinado que mutaciones en el gen *CBFA1* (core binding factor  $\alpha 1$ ), localizado en 6p21, originan la DCC. Este gen codifica un factor de transcripción que actúa sobre el mesénquima en fase embrionaria temprana, participando en la diferenciación de los osteoblastos. Estudios hechos en grandes series de familias y pacientes con DCC, han demostrado mutaciones de sentido equivocado y sin sentido, deleciones e inserciones en este gen, que afectan la función del factor de transcripción CBFA1. La mayoría de ellas son mutaciones de sentido equivocado dentro del dominio Runt, el cual está altamente conservado a lo largo de la evolución y entre distintas especies. Sin embargo, no se ha podido evidenciar una correlación sólida entre el tipo de mutación y la severidad de las manifestaciones clínicas. Los estudios en pacientes de distinta

procedencia étnica, han evidenciado una penetrancia del 100%, con expresividad variable intrafamiliar.

En esta tesis estudiamos dos pacientes con DCC clásica. El análisis molecular de su DNA reveló dos mutaciones y tres polimorfismos, ninguno de ellos descrito previamente. En un paciente se encontró una mutación de sentido equivocado en el dominio Q/A en el exón 1 (158 A→T [Q53L]), la cual lleva teóricamente a un reemplazo de un aminoácido polar por uno no polar. En el otro paciente se encontró una mutación poco común en el codón de terminación (1565 G→C[X522Y]), la cual resulta en una proteína de longitud mayor de la normal con 23 aminoácidos adicionales.

Estas mutaciones se describen en detalle y se discuten las posibles consecuencias de estos cambios, así como la trascendencia de futuros estudios sobre este gen. Nuestros hallazgos expanden el número de variantes alélicas dentro de esta patología.

## ANTECEDENTES

### Historia

Las displasias óseas son un diverso y complejo conjunto de enfermedades hereditarias. La variedad de sus manifestaciones clínicas refleja los mecanismos básicos del desarrollo óseo: su organización, la formación del hueso y el cartilago, su crecimiento y su homeostasis. El descubrimiento reciente de las bases moleculares de algunos de estos trastornos esqueléticos, ha permitido un significativo avance para develar la raíz de estos procesos (Mundlos et al, 1997).

La Displasia Cleidocraneal (DCC) es una displasia ósea bien definida, con hallazgos clínicos característicos y una forma de herencia autosómica dominante. Los primeros reportes de pacientes con defectos claviculares aparecen en la literatura desde 1765 (Martín, 1765), pero probablemente, fue Scheuthauer (Scheuthauer, 1871) quien describió primero el síndrome en forma minuciosa. Marie y Sainton (Marie et al, 1898) acuñaron el nombre de "dysostose cléidocrânienne héréditaire" para esta patología. Entre las familias reportadas a la fecha la más llamativa (Jackson, 1951) consistía en los descendientes de un paciente de origen chino llamado Arnold, quien en Sudáfrica tomó siete esposas, encontrándose que de 356 miembros de esta genealogía 70 presentaban "cabeza de Arnold" (Bick, 1968) (Ramesar et al, 1996). Existe otra familia reportada por presentar retraso en la erupción de dientes permanentes y deciduales, cuyos miembros actualmente se consideran como probables portadores de DCC (Arvystas, 1976).

Anteriormente se pensaba que la DCC sólo involucraba huesos de origen membranoso. Recientemente, en investigaciones detalladas, se ha demostrado que la DCC es una displasia ósea generalizada, que afecta no sólo las clavículas y el cráneo, sino el esqueleto entero. Por lo tanto, la DCC se considera como una displasia, más que como una disostosis (Rimoin, 1978).

### **Características Clínicas**

Las características clínicas de la DCC, han sido revisadas por varios autores (Cole et al, 1951; Schuch et al, 1967; Jarvis et al, 1974; Gorlin et al, 1990; Chitayat et al, 1992). La tabla 1 resume los hallazgos clínicos y radiológicos típicos. Este padecimiento presenta un fenotipo que abarca un amplio espectro de manifestaciones.

El crecimiento craneofacial está afectado en muchas formas (Jensen et al, 1995; Jensen et al, 1993). Existe braquicefalia, el perímetro cefálico está en límites superiores sin llegar a la macrocefalia, hay retraso en la osificación de huesos del cráneo manifestado con presencia de huesos wormianos, fontanelas anterior y posterior abiertas, así como parietales pequeños, dando la apariencia de un cráneo relativamente largo. En algunos preescolares puede observarse un retraso generalizado en la osificación del cráneo y en casos extremos, los huesos parietales están ausentes al nacimiento. El hueso frontal es prominente acompañado de hipertelorismo y existe hundimiento medio frontal por defectos en la osificación de la sutura metópica. La base del cráneo es pequeña con diámetro sagital disminuido y foramen mágnum amplio. Frecuentemente, los senos paranasales son hipoplásicos o están ausentes. Otros cambios incluyen huesos nasales pequeños o ausentes, las narinas son antevertidas y cortas y la maxila



hipoplásica, dando la impresión de hipoplasia media facial con relativo prognatismo (Jackson et al, 1951), en ocasiones se observa la mandíbula hendida por retraso en la unión de la sínfisis mandibular. Pueden agregarse a este cuadro otros datos menos frecuentes como hipoacusia y otoesclerosis.

Frecuentemente, el paladar es alto y arqueado y se presentan hendiduras en paladar blando o duro. Los dientes pueden mostrar distintas anomalías que son muy constantes en la DCC (Jensen et al, 1990), como retraso en la erupción de la dentadura primaria o permanente, dientes supernumerarios, aplasia, raíces malformadas, quistes retenidos, caries e hipoplasia del esmalte. La afección dental es importante cuando, durante la adolescencia, hay pérdida progresiva de los dientes deciduales. Los procedimientos quirúrgicos para promover la erupción dental incluyen la extracción de todos los dientes deciduales y la remoción del hueso sobre los dientes que no han emergido. La situación es bastante complicada debido a la presencia de múltiples dientes supernumerarios que desplazan a los dientes permanentes en desarrollo y obstruyen su erupción. El gran número de dientes supernumerarios, en ocasiones parece una dentadura terciaria ( más de 30 dientes extra en algunos casos ) y constituye uno de los hallazgos más sorprendentes de la DCC (Hitchin, 1975). Se ha reportado morfología dental anormal (Lukinmaa et al, 1995). Por lo general, es necesario un tratamiento ortodóncico y quirúrgico a largo plazo con el fin de activar la erupción y alinear los dientes permanentes impactados (Becker et al, 1997; Jensen et al, 1992).

Las clavículas son hipoplásicas o están ausentes, por lo que los hombros se observan estrechos y caídos y pueden aproximarse fácilmente, dependiendo

del grado de afección clavicular. En muchos pacientes no se presenta discapacidad física asociada a este defecto. De acuerdo a observaciones clínicas de varios grupos (Jarvis et al, 1974; Stocks et al, 1981), la ausencia de clavícula es rara, mientras que el extremo acromial se encuentra casi siempre afectado, por lo general en forma bilateral. Formas menos frecuentes de afección clavicular consisten en clavículas fragmentadas en dos o presencia del extremo acromial con ausencia del esternal. El segmento faltante puede estar representado por pseudoartrosis fibrosa o por una cuerda fibrosa, por lo que los pacientes pueden mostrar hombros normales a la inspección, siendo necesario indicar placas de rayos X para esclarecer esa anomalía. Ocasionalmente, se han descrito pacientes con clavículas normales (Cole et al, 1951; Stocks et al, 1981).

Los hallazgos radiológicos también incluyen un tórax estrecho, con forma de campana y costillas cortas y oblicuas, que puede causar dificultad respiratoria en la infancia temprana (Chitayat et al, 1992). No son raras las costillas cervicales o faltantes (Lechelle et al, 1936). Las escápulas en ocasiones son pequeñas, con deficiencias en las facetas acromiales y fosas supraespinosas. Como cabe esperar, existen deficiencias musculares acompañantes. Se han descrito varios pacientes con siringomielia, al parecer su asociación con DCC es más frecuente de lo que generalmente se ha reconocido (Dore et al, 1987). Otras anomalías acompañantes pueden ser espina bifida oculta, escoliosis, espondilolisis, espondilolistesis y osificación parcial del hueso hioides (Reed et al, 1993).

La pelvis se encuentra invariablemente alterada e incluso Crouzon y Buttier (Crouzon et al, 1921) habían propuesto el nombre de "forme cleido cranio-pelvienne" para esta patología. El incremento en la distancia entre los huesos

púbicos se debe a retraso en la osificación durante la edad adulta. Otros cambios incluyen hipoplasia y rotación anterior de las alas del ilíaco y articulaciones sacroilíacas amplias, cuello femoral corto y ancho, con o sin coxa vara o valga, acetábulo aplanado, epífisis femorales largas y genu valgum. En las mujeres embarazadas, las pelvis displásicas frecuentemente requieren cesárea.

Además de los datos anteriores, las epífisis son cónicas y el segundo metacarpiano muestra consistentemente dos centros de osificación (Jensen, 1990; Chitayat et al, 1992) La osificación del carpo es lenta. Los dedos en manos y pies pueden ser de longitud asimétrica, las uñas y las falanges distales frecuentemente son hipoplásicas. No es raro observar epífisis cónicas y cierre prematuro de los discos epifisarios, lo cual lleva a acortamiento de otros huesos.

La estatura final está significativamente reducida. Investigaciones previas indican que la longitud al nacimiento es normal, pero la estatura cae por debajo del 2º. percentil entre los cuatro y ocho años (Kempfle, 1965, Levin et al, 1963). En un estudio efectuado por (Jensen, 1990), las mujeres se encontraban más afectadas que los varones. La estatura puede ser proporcionada, o con extremidades cortas en relación con el tronco, siendo esto más aparente en las superiores.

En estudios recientes, se observó en algunos miembros de una familia Menonita únicamente un cuadro con anomalías dentales, refiriéndose como fenotipo dental aislado (Zhou et al, 1999) o DCC *forme frustré*. En la misma familia se encontraron pacientes afectados con DCC clásica. Todos portaban la misma mutación.

Los hallazgos clínicos sugieren que el gen responsable no está activo sólo durante el desarrollo temprano, sino que también es importante durante la etapa

fetal y el crecimiento postnatal, ya que se implican cambios en la forma y número de los huesos (Mundlos et al, 1999).

<b>Tabla 1. Características clínicas y Radiológicas</b>	
<b><i>Clínicas</i></b>	<b><i>Radiológicas</i></b>
<b>Cráneo</b>	
Braquicefalia	Huesos wormianos múltiples
Abombamiento frontal y parietal	Engrosamiento segmental del cráneo
Suturas y fontanelas abiertas	Suturas no osificadas
Retraso en el cierre de fontanelas	Fontanelas persistentes
Prognatismo relativo	Cambios displásicos en basioccipucio
Puente nasal deprimido	Hipoplasia de maxila
Hipertelorismo	Retraso en la mineralización
	Retraso o ausencia de la calcificación de los huesos nasales
	Senos paranasales hipoplásicos
<b>Tórax y hombros</b>	
Capacidad de juntar los hombros	Clavículas discontinuas, aplásicas o hipoplásicas
Hombros estrechos y caídos	Tórax en forma de campana
Dificultad respiratoria en la infancia temprana	Costillas cervicales
Movilidad incrementada	Costillas faltantes
	Escápula hipoplásica
<b>Pelvis</b>	
Sección cesárea	Retraso en la osificación del hueso púbico
	Hipoplasia de las alas del ilion
	Articulaciones sacroiliacas amplias
	Cuello femoral grande
	Epifisis grandes
<b>Columna</b>	
Escoliosis	Hemivértebras, acuñaamiento posterior
Xifosis	Espondilolisis y espondilolistesis
	Espina bífida oculta
<b>Manos</b>	
Braquidactilia	Acortamiento de falanges medias y de III y IV metacarpianos y metatarsianos
Dedos en punta	Falanges distales hipoplásicas
Displasia o hipoplasia ungueal	Epifisis accesorias en II metacarpianos
Pulgares cortos, anchos	II metacarpianos largos
Clinodactilia del 5º. dedo	Epifisis cónicas
<b>Dentición</b>	
Dientes deciduales normales	Dientes supernumerarios impactados
Dientes supernumerarios	
Retraso en la erupción	
Maloclusión	
Dientes en empalizada	

## Diagnóstico diferencial

La triada característica de este padecimiento consiste en clavículas hipoplásicas, fontanelas abiertas y dientes supernumerarios, aunque existe expresividad variable, aún intrafamiliar, por lo que uno o dos de estos elementos pueden faltar. Se debe hacer diagnóstico diferencial en especial con otras patologías que cursan también con hipoplasia o agenesia clavicular (Hall, 1982). La Pseudoartrosis congénita de la clavícula (MIM 118980) está entre las más comunes. En la gran mayoría de estos casos, la afección es unilateral, predominando en el lado derecho; se presenta en forma esporádica y ninguno otro hueso está involucrado.

La Picnodisostosis (MIM 265800) comparte algunas características con la DCC, como retraso en el cierre de suturas y fontanelas, huesos wormianos, hipoplasia clavicular, dientes permanentes irregulares, anodoncia y retraso en la erupción. Sin embargo, en los estudios radiológicos, el aumento en la densidad ósea (osteoesclerosis) y la ausencia de dientes supernumerarios, así como la acro-osteolisis de las falanges distales, hacen una rápida distinción entre los dos. Clínicamente la Picnodisostosis se presenta con patrón de herencia autosómico recesivo y los pacientes exhiben una facies característica. La base de esta enfermedad consiste en un defecto raro de la función de los osteoclastos y se debe a mutaciones en el gen que codifica la enzima lisosomal Catepsina K.

La hipoplasia clavicular, suturas abiertas y huesos wormianos, también están presentes en la Displasia mandibuloacral (MIM 248370), sin embargo, esta entidad está caracterizada principalmente por acro-osteolisis de las falanges

distales. Se han descrito una paciente y su hijo con Hipoplasia clavicular (MIM 188550), en la cual no están otros huesos involucrados.

El Síndrome de Yunis-Varon (MIM 216340) con micrognatia y afalangia distal, tiene rasgos parecidos a los de la DCC, sin embargo, presenta herencia autosómica recesiva y es usualmente una condición letal. Se caracteriza por retraso en el crecimiento intrauterino, ausencia de succión, suturas y fontanelas amplias, agenesia o hipoplasia de los pulgares de las manos y pulgares anchos en los pies, ausencia o hipoplasia de clavículas y displasia pélvica. Se puede distinguir fácilmente de la DCC por los pulgares característicos y una estructura ósea irregular y a veces esclerótica.

La hipoplasia de clavículas se ha reportado en asociación con varias anomalías citogenéticas, las cuales incluyen translocaciones y duplicaciones de 8q22 (Brueton et al, 1992), trisomía parcial 11q (Franke et al, 1977), trisomía parcial 11q;22q (Nakai et al, 1979) y trisomía 20p (Schinzel, 1980). Sin embargo, ninguno de estos pacientes exhibía un fenotipo completo de DCC.

Como la hipoplasia clavicular, el retraso en el cierre de fontanelas y suturas es un signo inespecífico. Las suturas craneales amplias pueden significar un aumento de la presión intracraneal o craneosinostosis en otra sutura. Puede estar presente también en otros síndromes con alteraciones del crecimiento óseo. Además, las suturas irregulares han sido observadas en asociación con deleciones del extremo distal de 6p (Palmer et al, 1991). Por otra parte, el retraso en la erupción dental sin dientes supernumerarios, es visto frecuentemente en condiciones con remodelación ósea anómala, como Osteopetrosis y Picnodisostosis. La falla en la erupción de los dientes permanentes ha sido

reportada como un rasgo autosómico dominante (MIM 125350). Los dientes supernumerarios han sido descritos en el Síndrome de Gardner (MIM 175100).

En 1975, (Goodman et al, 1975) describieron tres pacientes de dos familias con una forma severa de DCC, cuya segregación sugería una forma de herencia autosómica recesiva. Los hallazgos moleculares recientes hacen que esto sea bastante improbable, estando la mayoría de los argumentos a favor de la presencia de mosaicismo germinal en uno de los padres o de la ocurrencia de mutaciones *de novo* en estos casos (Zackai et al, 1997).

### **Embriología**

Para analizar la etiología de este padecimiento, debemos recordar que, embriológicamente, existen dos clases de hueso: intramembranoso y endocondral, con diferencias importantes durante su formación en la cinética del proceso de mineralización (Dziedzic et al, 1988).

El sistema esquelético se desarrolla a partir de mesodermo y células de la cresta neural (Couly et al, 1993; Kontges et al, 1996) (Fig. 1). A medida que se forma la notocorda y el tubo neural, el mesodermo intraembrionario lateral a estas estructuras se condensa para formar dos columnas longitudinales de mesodermo paraaxial, las que al fin de la tercera semana en embriones humanos, se segmentan en somitas. Cada somita se diferencia en dos partes; la ventromedial se conoce como esclerotoma y sus células forman las vértebras y las costillas. El resto de la somita se denomina dermomiótoma, sus células forman los mioblastos y la dermis de la piel (Moore et al, 1993).

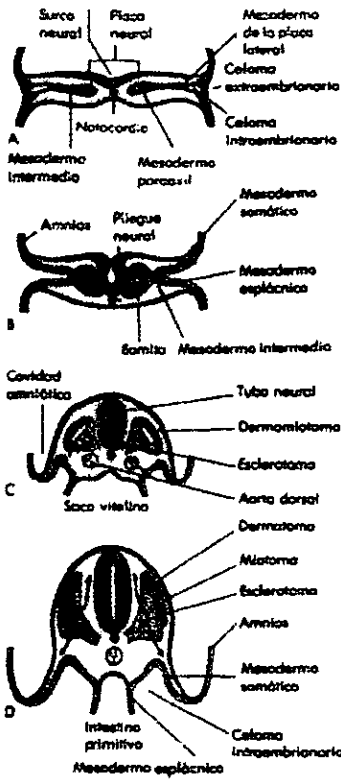


Fig 1. Cortes transversales de embriones de diversas edades que ilustran la formación y diferenciación temprana de las somitas. A. Embrión presomita (18 días) que muestra el mesodermo paraxial del cual derivan las somitas. B. Embrión de unos 22 días. C. Embrión de casi 26 días. La región del dermatomiótomo de la somita origina un miótomo y un dermatoma. D. Embrión de casi 28 días. Las flechas indican las direcciones de los remanentes de las somitas y del tubo neural en relación con la notocorda.

Las células mesodérmicas originan el mesénquima, que es tejido conectivo embrionario laxo. También parte del mesénquima en la región de la cabeza deriva de las células de la cresta neural, que migran hacia los arcos branquiales o faríngeos y forman huesos y tejido conectivo de las estructuras craneofaciales. Una vez que se han formado las condensaciones mesenquimatosas que prefiguran cada futuro elemento esquelético, entre los 10.5 y 12.5 días postcoito (dpc) en el ratón, éstos pueden evolucionar hacia una de dos vías (Horton, 1993):

*Osificación intramembranosa.* Este tipo de formación ósea ocurre en el mesénquima que formó una capa membranosa. El mesénquima se condensa y se torna muy vascular; algunas células se diferencian directamente hacia osteoblastos, que aparecen en el 15.5 dpc del desarrollo del ratón (Hall et al,



1992; Huang et al, 1997). Los osteoblastos comienzan a depositar matriz o sustancias intercelulares que se llaman tejido osteoide o prehueso, luego se separan entre sí casi por completo y su contacto se conserva en algunos procesos muy pequeños. A continuación se deposita fosfato de calcio en el tejido osteoide, a medida que se organiza el hueso. Los osteoblastos quedan atrapados en la matriz y se transforman en osteocitos. Este proceso da origen a los huesos planos del cráneo y la cara y los de las clavículas.

*Osificación endocondral.* Es el proceso que da origen al resto del esqueleto a través de diversos pasos. Comienza con la diferenciación hacia condrocitos de las células de las condensaciones mesenquimatosas, formando el "molde de cartílago" de los futuros huesos (fig. 2). En un hueso largo, la región de la formación ósea en el centro del cuerpo (posteriormente diáfisis) se llama centro de osificación primario. En esta zona, las células aumentan de tamaño (hipertrofia), se calcifica la matriz y luego mueren las células. Al mismo tiempo, se deposita una capa delgada de hueso bajo el pericondrio, que rodea la diáfisis; de esta manera, el pericondrio se constituye en periostio. La invasión vascular proveniente del periostio rompe el cartílago. Algunas células invasoras se diferencian en células hematopoyéticas de la médula ósea y otras en osteoblastos, que depositan matriz ósea en las espículas del cartílago mineralizado, el cual es posteriormente remodelado por la acción de osteoblastos y osteoclastos (Marks et al, 1996). La reorganización interna del hueso se lleva a cabo durante toda la vida. Al nacer, los cuerpos o diáfisis se osificaron en gran parte, sin embargo casi todos los extremos o epífisis aún son cartilagosos.

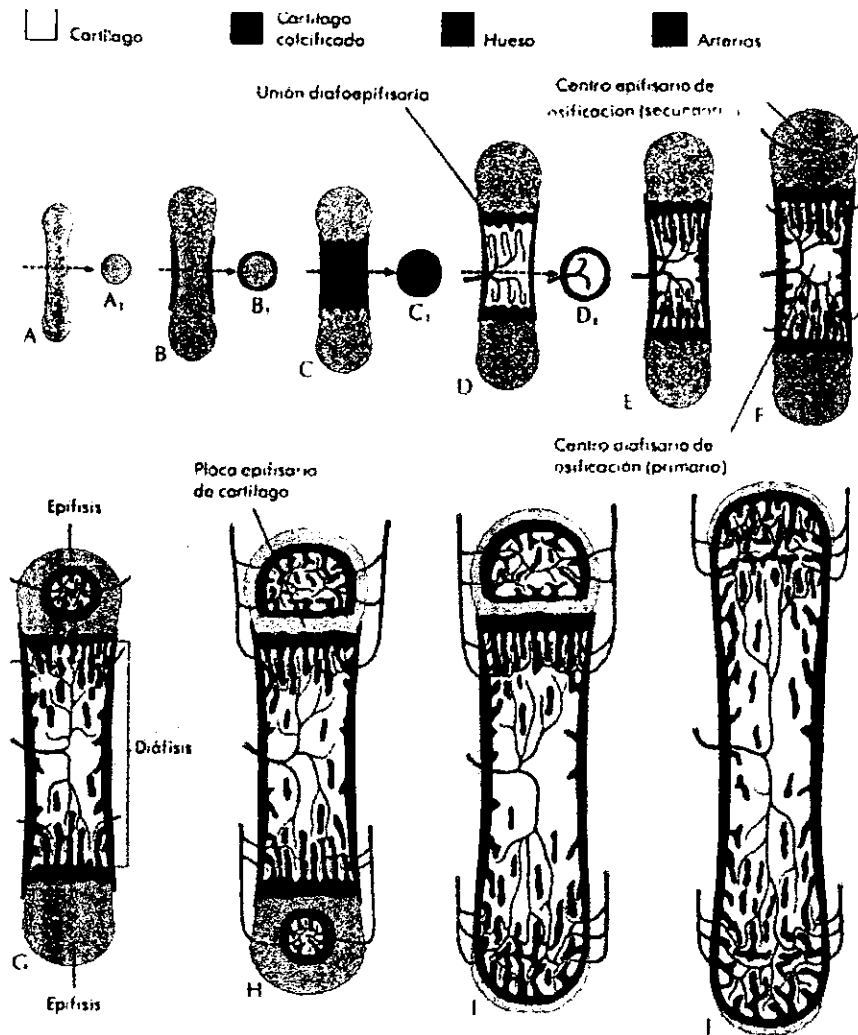


Fig. 2. Diagramas de osificación endocondral. A. Modelo cartilaginoso del hueso. B. Aparece un anillo superosteóico de hueso. C. Comienza a calcificarse el cartilago. D. Penetra el mesénquima vascular en el cartilago calcificado. E. En cada unión de diáfisis con epífisis hay una zona de osificación. F. En el cartilago epifisario superior penetran vasos sanguíneos y mesénquima. G. Crecimiento del centro epifisario de osificación. H. Se desarrolla un centro similar en la placa de cartilago epifisario inferior. I. Osificación de la placa del mismo. J. La placa de cartilago epifisario superior se osifica, lo que forma una cavidad medular ósea continua. Modificado de :Bloom W: A textbook of Histology 1986.

En la actualidad, además de las osificaciones intramembranosa y endocondral, se reconoce que el tejido condroide, que también se diferencia a partir del mesénquima, es un factor importante para el crecimiento del esqueleto (Dhem, 1989).

## Búsqueda del gen para la diferenciación de osteoblastos

Sin importar su origen, las células mesenquimatosas son células multipotenciales capaces de diferenciarse en tejido muscular, adiposo o cartilaginoso (Rodan et al, 1997) (fig.3).

Lo anterior lleva a preguntarnos cuáles son las señales que deben existir para que la diferenciación hacia uno u otro tejido se lleve a cabo. En estudios *in vivo*, se ha visto que estas señales pueden provenir del ambiente celular inmediato, vía interacciones célula-célula o célula-matriz, así como por medio de moléculas difusibles. Estas señales externas, al llegar a células receptoras, disparan vías reguladoras que llevan a la diferenciación de cada linaje celular.

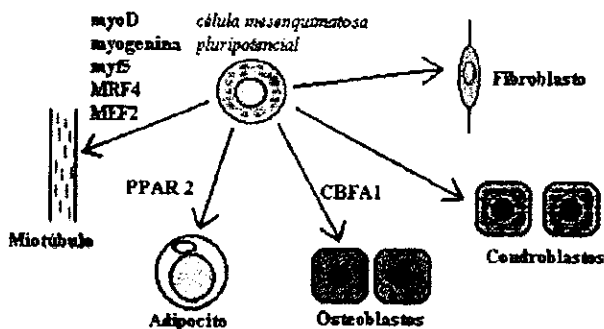


Fig. 3. Vías de diferenciación de las células mesenquimatosas pluripotenciales. Modificado de : Rodan GA, Harada S. Cell 1997; 89:677-80.

Al estudiar la vía de diferenciación de los mioblastos se descubrieron los factores de transcripción MyoD, miogenina y Myf-5, que establecieron el importante paradigma de la estructura hélice-vuelta-hélice (Weintraub, 1993). Estos factores son codificados por los llamados "genes maestros", que una vez inducidos realizan la expresión secuencial de otros factores de transcripción y de

genes fenotipo-específicos (Rawls et al, 1997). Posteriormente se describieron factores de transcripción importantes en la diferenciación de adipocitos, entre los que destaca PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ 2) (Tontonoz et al, 1994). Sin embargo, aún se conocía poco acerca de la vía de diferenciación de los osteoblastos.

Se encontró que las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), miembros de la superfamilia TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), están entre las señales extracelulares que pueden inducir el fenotipo osteoblástico a partir de las células mesenquimales pluripotenciales. Las BMPs fueron descubiertas aislándose como proteínas extraídas de hueso, capaces de inducir la formación de tejido cartilaginoso y óseo cuando se inyectaban por vía subcutánea, intramuscular o periosteal en ratas u otras especies (Reddi, 1997). Las BMPs juegan un importante papel en la morfogénesis y en la determinación del eje corporal (Graff, 1997) y se expresan en embriones de ratón en sitios de formación de hueso y cartílago (Hogan, 1996). Estas proteínas pueden suprimir la expresión miogénica o adipogénica e inducir la expresión condrogénica u osteogénica, tanto en células multipotenciales como en células inicialmente diferenciadas.

Adicionalmente, se encontraron sólo dos genes que controlan la diferenciación de los osteoblastos directa o indirectamente, *Indian hedgehog* (Ihh) y *Cbfa1* (core binding factor  $\alpha$ 1). Tal vez esta escasez de conocimiento pueda deberse a que los osteoblastos pueden llegar a verse sólo como un fibroblasto complejo, ya que los osteoblastos expresan los mismos genes que los fibroblastos (Aubin et al, 1996), más algunos genes extra, tales como los que codifican para la

Sialoproteína de hueso y la Osteocalcina. Debido a que esta última es la única proteína verdaderamente osteoblasto-específica (Hauschka et al, 1989; Desbois et al, 1994; Ducy et al, 1996), la mayoría de los estudios se concentraron en analizar al promotor de su gen, mediante la búsqueda de elementos osteoblasto-específicos que actúan en *cis* (OSEs).

Por medio de ensayos en ratones, se descubrieron dos elementos osteoblasto-específicos, OSE1 y OSE2 (Ducy et al, 1995; Towler et al, 1994). El análisis comparativo de secuencias reveló que la secuencia nuclear de OSE2 era similar al sitio de unión a DNA de los factores de transcripción relacionados con Runt/Cbfa, encontrándose una relación inmunológica y funcional entre las proteínas OSE2 y Runt/Cbfa (Geoffroy et al, 1995; Merriman et al, 1995). Al usar como sonda al dominio Runt de cada uno de los miembros de la familia Cbfa murina y probarla en una biblioteca de cDNA de osteoblastos primarios; se identificó un solo tipo de transcrito, correspondiente a Cbfa1. Su alto nivel de expresión en osteoblastos fue confirmado por ensayos Northern blot y Western blot (Ducy et al, 1997; Ducy et al, 1999). Por medio de análisis de secuencias y ensayos de unión a DNA, se localizaron sitios de unión para Cbfa1 en el promotor de *OG1* (gene murino de Osteocalcina) y en los genes que codifican Sialoproteína de hueso, Osteopontina y Colágena  $\alpha 1$ . Con estos estudios se confirmó a Cbfa1 como regulador de la expresión de estos genes, en experimentos *in vitro* e *in vivo*. (Banerjee et al, 1996; Banerjee et al, 1997; Ducy et al, 1997; Ji et al, 1998; Jiménez et al, 1999; Porte et al, 1999). También se comprobó que Cbfa1 puede

actuar como un factor de diferenciación hacia el linaje de los osteoblastos (Ducy et al, 1997).

### **La familia de factores de transcripción con dominio Runt**

CBFA1 pertenece a la familia de factores de unión nuclear con dominio Runt (Ogawa et al, 1993). También es conocido como PEBP2 $\alpha$ A (polyoma enhancer binding protein 2 $\alpha$ A), AML3 (acute myeloid leukemia 3), Osf2 (osteoblast specific factor 2) y como RUNX2 (runt-related transcription factor 2). Los otros dos miembros de la familia son los genes *CBFA2/PEBP2 $\alpha$ B/AML1* (Bae et al, 1993) y *CBFA3/PEBP2 $\alpha$ C/AML2* (Levanon et al, 1994; Bae et al, 1995) (fig.4).

En 1995, el comité de nomenclatura de genes decidió utilizar el término Cbfa para todos los genes de esta familia (Speck et al, 1995). CBF es un regulador transcripcional heterodimérico específico de células T (Wijmenga et al, 1995) que consta de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Se conoce un solo gen que codifica la subunidad  $\beta$  llamado CFBF y tres genes que codifican las subunidades  $\alpha$ , las cuales contienen una región de 128 aminoácidos conservada evolutivamente y llamada dominio Runt por su homología con la proteína codificada por el gen *Runt* de la regla par de *Drosophila melanogaster* (Kagoshima et al, 1993), el cual desempeña un papel relevante en la formación del patrón de segmentación corporal, la determinación sexual y el desarrollo del sistema nervioso central (Ogawa et al, 1993; Kania et al, 1990). Igualmente, el dominio Runt comparte homología con el producto de otro gen de *Drosophila* llamado *lozenge* (Daga et al, 1996).

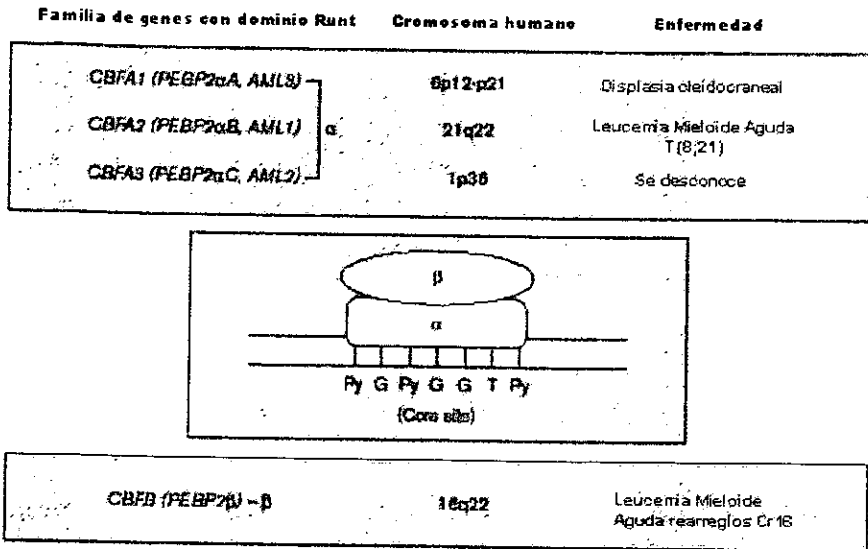


Fig. 4. Localizaciones cromosómicas de los genes con dominio Runt y enfermedades relacionadas. Los productos de estos genes forman heterodímeros con el coactivador transcripcional CBFB y reconocen la secuencia específica PyGPyGGTPy.  
Modificado de: Komori et al. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:494-9.

La subunidad  $\alpha$  de estos factores de transcripción se une al surco mayor del DNA (Thornell et al, 1988), a través del dominio Runt, previa unión de éste con la subunidad  $\beta$ , llamada CBFB/PEBP2 $\beta$  (Ogawa et al, 1993; Wang et al, 1993), la cual no interactúa directamente con el DNA (Fig.5) (Warren et al, 2000). La secuencia consenso de unión al DNA es PyGPyGGTPy (Py: pirimidina), originalmente identificada como un *enhancer* en el poliovirus (Kamachi et al, 1990) y el virus de la leucemia murina (Wang et al, 1992). También está presente en muchos genes específicos de células T (Satake et al, 1995), en genes codificantes de las enzimas mieloperoxidasa, neutrófilo elastasa y granzima B y en muchos genes que codifican citocinas y sus receptores (Komori et al, 1997).

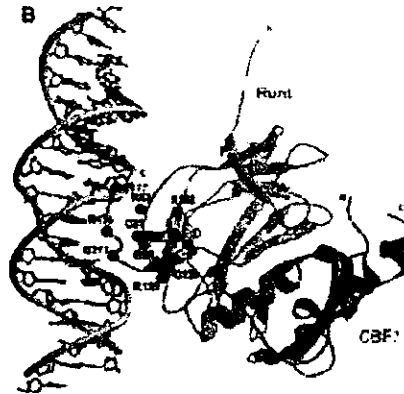


Fig. 5. Modelo de orientación del heterodímero del dominio Runt con CBFβ con respecto a la forma B del DNA. Los residuos de aminoácidos mutados en humanos se muestran en esferas azules. El dominio Runt se muestra en azul claro y CBFβ en magenta. El modelo es consistente con el concepto de que CBFβ no contacta directamente la superficie del DNA. Modificado de : Warren et al. EMBO J 2000;19:3004-15.

Existe controversia acerca de si CBFβ se une *in vivo* a CBFA1 para realizar su función, como ocurre en los otros dos miembros de la familia (Thirunavukkarasu et al, 1998; Lu et al, 1995). Un dato significativo lo constituye el hecho de que el gen que codifica a CBFβ también esté implicado en translocaciones cromosómicas en la Leucemia Mieloide Aguda (AML), como resultado de *inv(16)(p13q22)*, *t(16;16)* y *del(16q22)* (Liu et al, 1993).

Los tres genes *CBFA* mapean en regiones cromosómicas relacionadas con translocaciones encontradas en leucemias o síndromes mielodisplásicos, y en el caso de *AML1* (Nucifora et al, 1993; Okuda et al, 1996; Wang et al, 1996), se ha demostrado que una fusión génica, la translocación (8;21)(q22;q22) es causa frecuente de AML (Speck et al, 1995; Look, 1997). Los genes *AML1* y *CBFB* son los más frecuentemente mutados en la leucemia aguda humana (Look, 1997).

Al realizar estudios de cada gen la familia CBFA, se localizó al gen *Pebp2a/Cbfa1* en el cromosoma 17 en el ratón (Bae et al, 1994; Bae et al, 1995) y por técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), se situó al gen *CBFA1*



en la región 6p21 en humanos (Levanon et al, 1994), confirmándose posteriormente este dato por otros grupos (Lee et al, 1997; Zhang et al, 1997).

### **Funciones y regulación de Cbfa1**

Para que un factor de transcripción esté implicado en un proceso de diferenciación, debe estar presente no sólo en las células diferenciadas, sino también en células progenitoras. Tal es el caso de Cbfa1. Aunque el primer osteoblasto aparece alrededor del día 14.5 dpc, la expresión de *Cbfa1* se inicia en el 10.5 dpc en el primordio del húmero (Ducy et al, 1997). En el ratón silvestre, la expresión de este gen progresa en todas las condensaciones mesenquimatosas y en las células del linaje osteoblástico en estadios posteriores de su desarrollo (Komori et al, 1997). Es un hecho remarcable que *Cbfa1* se exprese en cada futuro osteoblasto, independientemente de su origen embrionario y de su futuro proceso de osificación, ya que así representa el evento más temprano que unifica a todos los elementos del esqueleto. Otra característica importante es que, en cualquier estadio del desarrollo, o aún en la vida postnatal, la expresión de *Cbfa1* está restringida estrictamente a las estructuras del sistema esquelético. En efecto, ningún tejido blando expresa el gen a niveles detectables (Ducy et al, 1997).

En estudios recientes acerca de la regulación del gen *Cbfa1* (Alliston et al, 2001), se ha visto que TGF- $\beta$  inhibe su expresión y la del gen *OG1* de osteocalcina. Esta inhibición está mediada por Smad3, que interactúa físicamente con CBFA1 y reprime su actividad transcripcional. Esta represión ocurre en las células mesenquimatosas y provee un mecanismo de regulación central para la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos.

Por medio de estudios *in vitro* e *in vivo* (Zhou, 2000), se demostró que FGF/FGFR1 (fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor1) regula la expresión de *CBFA1*, activando subsecuentemente la transcripción de sus genes blanco, incluyendo los de osteocalcina y sialoproteína de hueso. Es posible que esta regulación esté mediada por MAPK (mitogen activated kinases), ya que la vía principal para la función de FGF está mediada por estas cinasas (Lemonnier et al, 2000; Opperman, 2000; Webster et al, 1997) (fig.6).

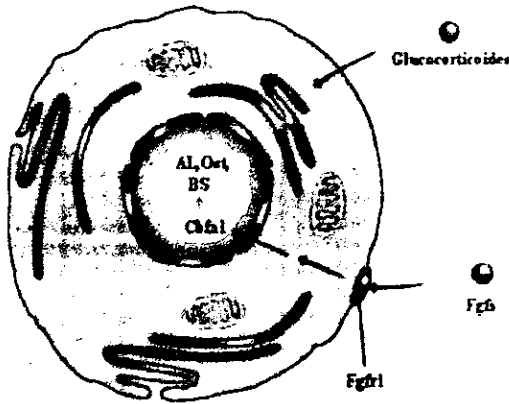


Fig. 6. Esquema de la regulación de la función y expresión de *Cbfa1*. AL: fosfatasa alcalina, Ost: osteocalcina, BS: sialoproteína de hueso. Diversos estudios demuestran que las señales *Fgfs/Fgfr1* están involucradas en el desarrollo normal de los huesos a través de la interacción con *Cbfa1*. Se ha documentado una disminución de la capacidad de unión de *Cbfa1* al DNA después del tratamiento de glucocorticoides. Modificado de: Zhou et al. HMG 2000;9:2001-8.

Aunque el patrón de expresión y las habilidades transcripcionales *in vitro* de *Cbfa1* eran claros indicadores su función en la regulación de la diferenciación de osteoblastos, la evidencia genética en ratones y humanos fue la que estableció inequívocamente su papel crítico en este proceso.

## El modelo en ratón

En 1978, un fenotipo similar a la DCC fue inducido en ratones irradiados con rayos gamma (Selby et al, 1978), pero fue hasta 1987 cuando se reconoció como el equivalente del síndrome DCC en humanos (Sillence et al, 1987). En la década siguiente, dos grupos independientes hicieron otros modelos en ratón por recombinación homóloga. Sus resultados fueron los siguientes:

*El ratón homocigoto.* En 1997 un grupo de investigadores, buscando una función de Cbfa1 en el desarrollo de células T, por medio de técnicas moleculares practicaron una delección de este gen en ratones, obteniendo un homocigoto *Cbfa1-/-* que presentó un fenotipo letal, con muerte neonatal inmediata sin respirar, peso y talla bajos y extremidades cortas, observando una distribución mendeliana de los embriones afectados. El estudio histológico reveló ausencia total de tejido óseo membranoso y endocondral y retención del esqueleto cartilaginoso sólo parcialmente calcificado. El análisis histoquímico mostró ausencia de células osteoblásticas, osteoclastos pequeños aislados y presencia de células hematopoyéticas que normalmente reemplazan cartílago calcificado y hueso. Por análisis de Northern blot se identificó una muy baja expresión de los genes relacionados con el fenotipo osteoblástico, como son fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina. No hubo evidencia de invasión vascular ni de células mesenquimatosas en el cartílago. Por lo tanto, estos datos sugirieron que tanto la osificación intramembranosa como endocondral estaban completamente bloqueadas, debido a la detención en la maduración de los osteoblastos y demostraron que Cbfa1 juega un papel esencial en la osteogénesis (Komori et al, 1997) (fig.7A).



Fig. 7A. Ausencia de osificación en el ratón mutante *Cbfa1* - /-. Día 17 post coito en el ratón wt (tipo silvestre), arriba y en el mutante homocigoto, abajo. Los embriones están teñidos con azul alcian (para cartilago) y rojo alizarina (para hueso). La osificación membranosa y endocondral están ausentes en *Cbfa1* - /-. Tomado de . Otto et al. Cell 1997; 89:765-71.

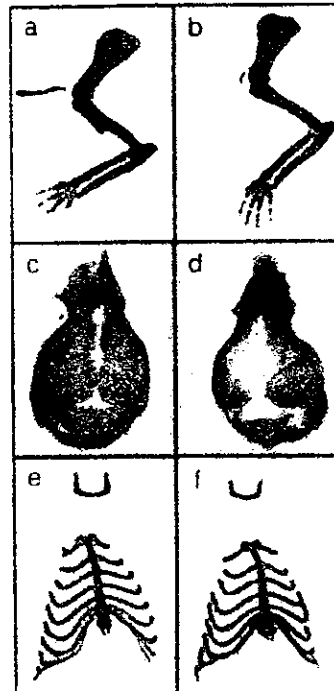


Fig. 7B. Fenotipo esquelético del ratón heterocigoto *Cbfa* +/- recién nacido. A y b) clavícula, escápula y extremidad superior del ratón wt (a) y +/- (b), donde la clavícula es rudimentaria y no existe tuberosidad del deltoides en el humero. C y d) neurocráneo de los ratones wt (c) y +/- (d). En este último las suturas y fontanelas son amplias, los huesos parietales e interparietales son hipoplásicos y están presentes numerosos huesos wormianos. E y f) hueso hioides y esternón con costillas. Se observa hioides hipoplásico con retraso en la osificación en el ratón +/- (f) comparado con su control wt (e). El proceso xifoideo es más amplio y cuenta con dos centros de osificación bien separados en +/- (f). Tomado de : Otto et al. Cell 1997, 89:765-71.

*El ratón heterocigoto.* En el modelo *Cbfa1+/-* (fig.7B), se demostró la presencia de hipoplasia clavicular, retraso en el desarrollo de huesos membranosos y retraso en la osificación de huesos del cráneo, que son características típicas del fenotipo de DCC humana, el cual además presenta dientes supernumerarios. Usando una secuencia genómica de 7kb y el gen reportero *lacZ*, se documentó que la expresión de *Cbfa1*, correspondía con los sitios y tiempo de aparición de la osteogénesis embrionaria. Por lo tanto, el ratón heterocigoto es un paradigma para la enfermedad humana (Otto et al, 1997).

De esta manera se corroboró el papel de *Cbfa1* como presunto factor de transcripción en la diferenciación de osteoblastos, cuya ausencia de función no puede ser compensada por ningún otro factor (Ducy et al, 1997; Ducy et al, 1999).

### **Las mutaciones en *CBFA1* causan DCC en humanos**

El gen para la DCC, fue localizado en 1995 (Mundlos et al, 1995) en el locus 6p21. No se observó evidencia de heterogeneidad de locus dentro de las diferentes familias analizadas. Este hallazgo que fue confirmado por otros grupos (Gelb et al, 1995; Ramesar et al, 1996; Feldman et al, 1995). En una familia se encontró una microdelección, sugiriendo que el fenotipo DCC era causado por haploinsuficiencia. Esta delección y otras descritas en rearreglos de 6p (Nienhaus et al, 1993), acotaron la región crítica a un intervalo de 2Mb entre los genes *TCTE1* y *MUT*, incluyendo a *CBFA1*.

En 1997, en base a los hallazgos de Otto en el ratón descritos anteriormente (Otto et al, 1997), el grupo de investigación de Mundlos, paralelamente al grupo de Lee, procedió a identificar las primeras mutaciones en el gen *CBFA1* en humanos. Se describieron delecciones largas en este gen en tres

pacientes no relacionados y posteriormente familias que mostraban inserciones, deleciones o mutaciones inactivadoras de un alelo o que causaban disrupción en el dominio Runt de CBFA1. En una familia con DCC, con alteraciones craneofaciales leves y una forma específica de braquidactilia, se encontró que las personas afectadas portaban 27 alaninas en vez de 17 en el dominio Q/A. Se asumió que esta expansión podía actuar de manera dominante negativa en la función de la proteína (Mundlos et al, 1997; Lee et al, 1997).

Con la posible excepción de la expansión de alaninas, puede predecirse que todas las mutaciones identificadas por estos grupos llevan a una pérdida parcial o completa de la función de la proteína CBFA1. Estos datos indican que las mutaciones en *CBFA1* segregan con el fenotipo DCC y que la presencia de un solo alelo funcional es suficiente para producir los hallazgos clínicos característicos de esta patología (Mundlos et al, 1997).

El grupo de Zhou intentó correlacionar el tipo de mutación con la expresión clínica en 26 pacientes. La mayoría de ellos presentaban mutaciones *de novo* de sentido equivocado, afectando los residuos conservados dentro del dominio Runt. Como consecuencia, no se obtenía unión al DNA ni transactivación del gen reportero utilizado. Estas mutaciones y las que producían terminación prematura en el dominio Runt, segregaban con el fenotipo clásico de DCC, debido a abolición de la función de transactivación de la proteína mutante con la consecuente haploinsuficiencia. Por medio de estudios funcionales, se demostraron dos mutaciones hipomórficas y dos mutaciones relacionadas con expresividad variable intrafamiliar, incluyendo anomalías dentales sin afección clavicular. Sus resultados

en conjunto demostraron que la pérdida variable de función debida a disrupción de los dominios Runt y PST, lleva a expresividad clínica variable (Zhou et al, 1999).

El grupo de Quack analizó 42 pacientes no relacionados. En ellos identificaron una serie de mutaciones de sentido equivocado en la arginina-225 (R225), que se sitúa dentro del área responsable de la señalización nuclear de la proteína. Mediante estudios *in vitro* demostraron que las mutaciones en R225, interfieren con la acumulación nuclear de la proteína CBFA1. Por lo tanto, se propuso a este residuo como elemento crucial para la función del gen. No se encontró diferencia fenotípica entre pacientes con mutaciones distintas, sugiriéndose que la DCC es generalmente causada por haploinsuficiencia (Quack et al, 1999).

En forma interesante, el mismo grupo describió a un paciente con DCC severa, con una mutación que ocasiona un corrimiento de marco de lectura en el codón 402. El paciente, masculino de 24 años, presentaba escoliosis, osteoporosis y fracturas recurrentes desde la niñez. Esto proporcionó la primera evidencia de que CBFA1 puede ayudar a mantener los huesos en los adultos, además de su función durante el desarrollo intraembrionario (Quack et al, 1999). En las Tablas 2 a 8 se enlistan las mutaciones reportadas del gen *CBFA1*.

Los estudios de mutaciones descritas en *CBFA1*, en pacientes de distinta procedencia étnica, evidenciaron una penetrancia del 100%, con expresividad variable intrafamiliar (Quack et al, 1999; Zhou et al, 1999; Zhang et al, 2000). Se observó que casi invariablemente se afecta la porción distal de la clavícula. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha podido establecer una clara relación fenotipo-genotipo.

## 2. Missense / nonsense

Accession Number	Codón	Nucleótido	Aminoácido	Referencia
CM992831	113	CTC-CGC	Leu-Arg	108
CM992832	118	AGCc- AGG	Ser-Arg	108
CM992833	121	TTC-TGC	Phe-Cys	108
CM992607	146	cGGA-TGA	Gly-Term	33
CM992608	169	CGG-CAG	Arg-Gln	33
CM970230	175	ATG-AGG	Met-Arg	86
CM992609	190	CGG-CAG	Arg-Gln	33
CM970231	191	AGT-AAT	Ser-Asn	86
CM992610	193	aCGA-TGA	Arg-Term	33
CM992611	199	TTGa-TTC	Leu-Phe	33
CM992612	200	gACC- GCC	Thr-Ala	33
CM993114	205	ACA-AGA	Thr-Arg	108
CM992613	209	CAA-CGA	Gln-Arg	33
CM992614	225	CGG-CAG	Arg-Gln	33
CM992834	225	tCGG-TGG	Arg-Trp	108
CM970232	297	TGGt-TGA	Trp-Term	107
CM992615	391	aCGA-TGA	Arg-Term	33

## 3. Inserciones

Accession Number	Nucleotido	Codón	Inserción	Referencia
CI992788	90	30	C	33
CI993085	1127	376	T	108
CI993086	1205	402	C	108
CI993282	1379	460	C	108



#### 4. Deleciones

Accession Number	codón	Delección	Referencia
CD992742	132	CTGGCGC^TGCaacAAGACCCTGC	33
CD993028	160	GGCGGGT^AACgaTGAAAATTAT	108
CD972111	179	AACCAA^GTAGcaaggttcaaCGATCTGAGA	107
CD992743	184	GTTCAAC^GATctGAGATTTGTG	33
CD992744	211	AAGTA^GCTACcTATCACAGAG	33
CD993029	274	TCTGCA^CCAaGTCCTTTTAAT	108
CD992745	294	ACAGTCT^TCCcCGCCGTGGTC	33
CD993248	295	TCTTCC^CCGCcGTGGTCCTAT	108
CD993030	304	CTTAC^CCCTCcTACCTGAGCC	108
CD993249	385	ACTGAG^AGCCgCTTCTCCAAC	108

#### 5. Rearreglos complejos

Descripción	Referencia
Del. 18 bp Ins. 34 bp nt. 145 cd. 49	107
GT-TC nt 366-367, L122L C123R	108

#### 6. Deleciones grandes

Descripción	Referencia
173 bp nt 220 (mutación descrita a nivel de DNA genómico)	33

#### 7. Splicing

Accession Number	IVS*	Donador/ Aceptor	localización relativa	Substitución	Referencia
CS992700	5	ds	+1	G-T	33

\* Salto del exón 5 dentro del marco de lectura.

8. Expansiones				
Accession Number	Secuencia amplificada	Rango Normal	Rango Patológico	Referencia
CE972855	GCK (en región codificante)	17 Ala	27 Ala	107

### Estructura de CBFA1

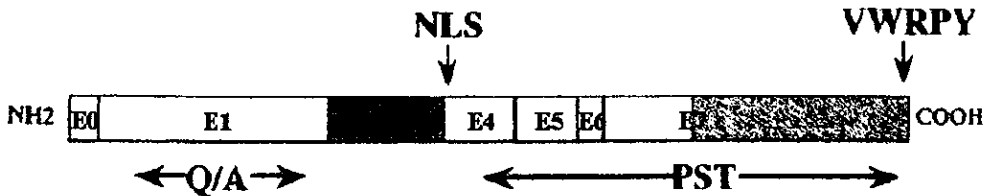


Fig. 8. Representación esquemática del gen *CBFA1*. Las cajas representan los exones (E). Los dominios de activación de la proteína se encuentran en color amarillo y los de represión en verde. El dominio Runt es representado en azul. Q/A: repetidos de glutamina/alanina, NLS: señal de localización nuclear, PST: región rica en prolina/serina/treonina, VWRPY: motivo c-terminal. Modificado de: Ducy P. Dev Dyn 2000; 219:461-71.

El gen *CBFA1* está constituido por ocho exones (fig. 8) que ocupan una región de 130 kb, pertenece a la familia de genes con dominio *runt*, homólogos al gen *runt* de *Drosophila melanogaster* (Bae et al, 1995). La proteína CBFA1, presenta un dominio funcional en el extremo amino-terminal, que contiene una serie de repetidos de poliglutamina y poliadenina (dominio Q/A), seguido por el dominio de homología con *runt* y un dominio rico en prolina-serina-treonina (PST), el cual consiste en dos subdominios, el amino-terminal con capacidad transactivadora y el carboxilo-terminal con capacidad para reprimir la transactivación. El extremo carboxilo-terminal consiste en un motivo VWRPY que

se encuentra evolutivamente conservado en todas las proteínas con homología a *runt* de todas las especies analizadas hasta ahora. La función de este motivo podría ser la unión con proteínas correpressoras, como las proteínas homólogas de Groucho en *Drosophila* (Stifani et al, 1992).

### **Función de *CBFA1* en la condrogénesis**

La hipoplasia clavicular es una de las principales características de DCC. Huang y colaboradores estudiaron el desarrollo de la clavícula en ratones con fenotipo silvestre y con displasia (*Ccd* / +). En el ratón *Ccd*, se lleva a cabo la condensación inicial de las células tallo mesenquimatosas, pero no existe diferenciación a células precursoras. Lo anterior resulta en ausencia del “molde” cartilaginoso para las clavículas. Con estos datos, se demostró que *Cbfa1* es un factor regulador crucial en la diferenciación de las células tallo mesenquimatosas en los precursores tanto de hueso como de cartílago (Huang et al, 1997).

Posteriormente, Inada y Kim encontraron en el ratón deficiente de *cbfa1* leves anomalías de la diferenciación de los condrocitos. En su fémur y húmero, se encontraron condrocitos inactivos y en proliferación, sin embargo, había carencia de condrocitos hipertróficos y de expresión de colágeno tipo X. Debido a que *cbfa1* se expresa en los condrocitos hipertróficos, este trastorno en su maduración podría ser el resultado directo de una función de *Cbfa1* en el control de su diferenciación terminal (Inada et al, 1999; Kim et al, 1999).

### **Función de *CBFA1* en la odontogénesis**

El desarrollo dental comienza con señales locales que emanan del ectodermo oral y que inducen cambios moleculares en el ectomesénquima derivado de la cresta neural. Distintos intercambios de señales moleculares entre el ectodermo dental y

el mesénquima regulan la morfogénesis dental y culminan con la diferenciación de odontoblastos, ameloblastos y cementoblastos y la formación de dentina, esmalte y cemento respectivamente (Thesleff et al, 1996; Thesleff et al, 1997)

Se ha encontrado que *Cbfa1* también se expresa en ameloblastos, observándose que en la odontogénesis, regula las interacciones epitelio/mesénquima que controlan el avance de la morfogénesis y la diferenciación histológica del esmalte (D'Souza et al, 1999).

## JUSTIFICACIÓN

La Displasia Cleidocraneal es un padecimiento de descripción molecular reciente, que no ha sido estudiado en población mexicana. Aunque no está determinada su frecuencia en nuestra población, en los últimos años, el servicio de Genética de Hospital General de México ha atendido varios casos de pacientes con Displasia Cleidocraneal clásica y algunos casos no clásicos que podrían requerir análisis a nivel molecular para mejor precisión en su diagnóstico. De los casos estudiados, se buscó una correlación fenotipo-genotipo, además de establecer las características genéticas de los cuadros clínicos no clásicos de DCC.

## OBJETIVOS

- Realizar la búsqueda de mutaciones en el gen *CBFA1* en pacientes con diagnóstico clínico de Displasia Cleidocraneal, mediante análisis molecular de su DNA.
  
- Establecer una correlación entre la localización y tipo de mutaciones y la severidad del cuadro clínico de la enfermedad en cada paciente.

## JUSTIFICACIÓN

La Displasia Cleidocraneal es un padecimiento de descripción molecular reciente, que no ha sido estudiado en población mexicana. Aunque no está determinada su frecuencia en nuestra población, en los últimos años, el servicio de Genética de Hospital General de México ha atendido varios casos de pacientes con Displasia Cleidocraneal clásica y algunos casos no clásicos que podrían requerir análisis a nivel molecular para mejor precisión en su diagnóstico. De los casos estudiados, se buscó una correlación fenotipo-genotipo, además de establecer las características genéticas de los cuadros clínicos no clásicos de DCC.

## OBJETIVOS

- Realizar la búsqueda de mutaciones en el gen *CBFA1* en pacientes con diagnóstico clínico de Displasia Cleidocraneal, mediante análisis molecular de su DNA.
  
- Establecer una correlación entre la localización y tipo de mutaciones y la severidad del cuadro clínico de la enfermedad en cada paciente.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Pacientes

Se realizó estudio molecular en dos pacientes con diagnóstico clínico de Displasia Cleidocraneal que fueron captados en el servicio de Genética del Hospital General de México y en el departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría.

### Caso 1

Paciente de 10 años, sexo femenino, valorada a los cuatro años de edad por presentar retraso en el cierre de fontanelas y suturas abiertas. Padres sanos no consanguíneos, con antecedente de un hijo menor con onfalocelo y un hijo mayor sano. Se documentó el antecedente de infecciones respiratorias de repetición e hipoacusia conductiva, y la indicación de adenoidectomía y septoplastía. Desde el nacimiento presentó catarata anterior en el ojo derecho, efectuándose pruebas de función metabólica, las cuales resultaron normales tanto en la paciente como en sus padres. A la exploración física se encontraron peso, talla y perímetro cefálico dentro del 3er percentil. Se observó la presencia de braquicefalia con fontanela anterior abierta, pestañas largas, nariz corta y ancha, filtrum corto. Los dientes eran pequeños y en empalizada y el paladar alto. Los hombros eran estrechos y la paciente era capaz de aproximarlos fácilmente. Se observó también tórax estrecho.

Por medio de estudios radiológicos se identificó la presencia de huesos wormianos en cráneo, ausencia de cierre de fontanelas, aplasia bilateral de clavículas, tórax en cono y retraso en la osificación vertebral.

## Caso 2

Paciente del sexo masculino con 16 años de edad, producto de la cuarta gesta de padres sanos no consanguíneos, con cinco hermanos normales. Contaba con antecedente de identificación al nacimiento de fontanelas amplias, asumiéndose el diagnóstico de Hidrocefalia Congénita, siendo manejado con conducta expectante. Acudió a nuestra consulta por presentar talla baja y retraso en la erupción dental. A la exploración física se encontraron los siguientes datos: estatura baja proporcionada, abombamiento frontal y parietal bilateral, fontanela anterior persistente, pico de viuda, implantación de cabello baja posterior, hipertelorismo, puente nasal deprimido, base de la nariz ancha, lóbulos auriculares prominentes, filtrum largo, retraso en la erupción dental, caries dental severa generalizada, dientes en empalizada y paladar alto. También presentó hipoacusia conductiva leve bilateral, cuello corto, hombros estrechos con capacidad de aproximarlos fácilmente, tórax estrecho y clinodactilia de quintos dedos de ambas manos.

Sus hallazgos radiológicos incluían huesos wormianos, ausencia de clavículas, hipoplasia maxilar, ausencia de desarrollo de senos frontales, falanges distales hipoplásicas en ambas manos y falanges medias hipoplásicas. También se identificó espina bífida oculta y retraso en la osificación de huesos púbicos.

Para la realización de este estudio se obtuvo consentimiento informado (ver Anexo 1) de los padres de ambos pacientes.





Fig. A. Paciente 2. Radiografía de cráneo que muestra la presencia de fontanela anterior abierta, huesos wormianos, dientes supernumerarios y mandíbula hendida.



Fig. B. Paciente 2. Radiografía de tórax mostrando la espina bífida oculta y ausencia de clavículas.

### **Criterios de inclusión:**

Uno o más de los siguientes:

- 1.- Agenesia o hipoplasia de clavículas involucrando tercio externo, uni o bilateral.
- 2.- Retraso en el cierre de fontanelas y/o la presencia de huesos wormianos.
- 3.- Anomalías dentales incluyendo dientes neonatales, supernumerarios o retraso en la erupción de dientes deciduales o permanentes.
- 4.- Otros defectos esqueléticos: Retraso en la osificación de huesos púbicos, escoliosis, anomalías vertebrales, costillas cervicales, escápulas pequeñas, dedos de longitud asimétrica, osteoporosis.

### **Criterios de exclusión:**

Otras displasias óseas.

## **Métodos**

### **Aislamiento de DNA genómico de sangre periférica**

Se llevó a cabo mediante una técnica modificada de dos métodos previamente descritos (Buffone et al, 1985; Kempter et al, 1992) con algunas modificaciones (Cuevas et al, 1998). Se extrajo asépticamente 3 ml de sangre periférica en un tubo Vacutainer con EDTA (ácido etilendiaminotetrascético) como anticoagulante. Se colocó la sangre en un tubo cónico de 15 ml, se agregó un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM pH 7.6, Tritón 1% v/v, Sacarosa 300 mM) invirtiendo el tubo varias veces. Se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min y se decantó el sobrenadante. Se agregó al botón 1ml de amortiguador TTS, se agitó y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml. Se agitó hasta homogenizar y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2min. Se decantó el sobrenadante, se agregó al botón 1ml de amortiguador TTS, se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se repitió el paso anterior 2-3 veces. Se agregó al botón limpio 570  $\mu$ l de NaCl 5mM, se agitó durante 2 min, se agregó 30 $\mu$ l de SDS 10% (dodecil sulfato de sodio) y se agitó durante 5 min. Se adicionó 200  $\mu$ l de NaCl (cloruro de sodio) saturado y se agitó durante 10 min. Se centrifugó a 11,500 rpm durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante a un tubo de ensaye de 13x100 mm estéril. Se añadió 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA. Se tomó el DNA con una varilla de vidrio, se enjuagó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. El DNA se resuspendió en 350  $\mu$ l de agua estéril en un microtubo a baño María a 60°C durante 2 h. La muestra de DNA se conservó a -20°C, manteniendo una alícuota de 100  $\mu$ l a 4°C.

## **Procesamiento de las muestras de DNA genómico**

Todas las muestras de DNA obtenidas se procesaron de la siguiente manera:

(1) Se asignó una clave de identificación por padecimiento seguida de un número progresivo y del año en curso. En cuanto a los controles, los masculinos tuvieron la clave CM y los femeninos la CF.

(2) La calidad y concentración del DNA genómico extraído en cada muestra se cuantificó mediante dos técnicas: electroforesis en gel de agarosa y análisis espectrofotométrico.

La primera de ellas consistió en analizar un gel de agarosa muy delgado al 0.8% teñido con bromuro de etidio. En el se aplicó una alícuota de las muestras problema (de concentración desconocida) junto con un estándar de concentración conocida y se separaron por electroforesis. El gel se analizó en una lámpara de luz UV y mediante la comparación de la intensidad de las bandas con el patrón se calculó la concentración de las muestras.

El análisis por espectrofotometría se basa en dos longitudes de misión: 260nm para cuantificar ácidos nucleicos y 280nm para proteínas. El factor de las lecturas  $260/280 \text{ nm} \geq 1.8$  se refiere a un DNA no degradado y libre de proteínas. Para el cálculo de DNA en ng/ml= $[(DO \text{ a } 260\text{nm}) \cdot (0.05) / 1000]$  (Sambrook et al, 1989).

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Por medio de la técnica de PCR se amplificó el marco de lectura abierta del gen *CBFA1*. Los pares de oligonucleótidos utilizados fueron los diseñados por Quack y colaboradores (1999) y fueron sintetizados en una casa comercial

(Accesolab, México), llevándose a una concentración final de 100 $\mu$ M. Para cada muestra se preparó una reacción estándar de 50  $\mu$ l (Sambrook et al, 1989) que contenía:

dNTPs (1mM cada uno)	4 $\mu$ l (80 $\mu$ M)
oligonucleótidos (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l de cada uno
Amortiguador 10X (MgCl <sub>2</sub> 1.5mM)	5 $\mu$ l (1X)
Ampli Taq DNA polimerasa	0.2 $\mu$ l (1U)
DNA genómico (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l (100 ng)
H <sub>2</sub> O estéril cbp	50 $\mu$ l

Para los exones uno y siete se adicionó DMSO 5% debido a su alto contenido de G-C. Simultáneamente, por cada muestra de paciente se amplificaron dos muestras controles y una muestra blanco. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer) con el siguiente programa: Previa desnaturalización a 95°C durante 5 minutos se sometieron las muestras a 35 ciclos de: 94°C-1 minuto, 60°C-1.5 minutos y 72°C-1.5 minutos con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

#### **Análisis electroforético de los productos de PCR**

Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 3.0% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 7.6-8.0), teñido con bromuro de etidio al 0.0002%, incluyéndose un carril con un marcador de peso molecular (escalera de 100pb, GIBCO BRL).

## **Elución de productos de PCR a partir de geles de agarosa**

Después de una reacción de PCR los productos necesitan purificarse para eliminar contaminantes que pudieran interferir posteriormente en la secuenciación del DNA. Este método se realizó utilizando un estuche comercial (QIAEX II, QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo está diseñado para la purificación de fragmentos de DNA de 40 pb a 50 kb a partir de geles de agarosa de 0.3-2.0% (agarosa estándar o de bajo punto de fusión) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 8.0) o TBE (Tris-borato 0.045M, EDTA 0.001M pH 8.0).

El fragmento de DNA se cortó del gel de agarosa con un bisturí estéril, eliminando el exceso de agarosa, y se transfirió un microtubo de 1.5 ml estéril. Se pesó y se le adicionó 3 volúmenes de amortiguador QX1 (ej. 300  $\mu$ l de amortiguador para 100 mg de agarosa). Enseguida se agregó 3-5  $\mu$ l de la solución QIAEXII (suspensión recién preparada) por cada microgramo de DNA. La reacción se incubó a 50°C durante 10 min para solubilizar la agarosa y permitir el enlace del DNA a las perlas de sílica de la solución QXII. Se mezcló mediante vórtex para mantener el QIAEX II en solución. Se centrifugó a 13,000 rpm/1 min y se desechó el sobrenadante mediante una micropipeta. Se lavó el precipitado con 500  $\mu$ l. de amortiguador QXI, se resuspendió por vórtex y se centrifugó nuevamente. Se eliminó todo el sobrenadante con una micropipeta (en este paso se retiraron los residuos de agarosa contaminante). Posteriormente, se lavó el precipitado con amortiguador PE 2 veces para eliminar los residuos de sales). El botón se secó al aire durante 10-15 min o hasta que el precipitado se viera blanco.

Finalmente, para eluir el DNA se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 1min y se colectó el sobrenadante (que ahora contenía al DNA) a un microtubo estéril. El DNA purificado se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Secuenciación de DNA**

La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando un paquete comercial (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer) y siguiendo las instrucciones del proveedor para el analizador genético ABI PRISM 310.

La reacción de secuenciación directa se realizó en un microtubo estéril de 200  $\mu\text{l}$  y se mezclaron los siguientes reactivos:

Big Dye Terminator kit	8.0 $\mu\text{l}$
Templado de DNA (producto de PCR, 30 ng/ml)	3-6 $\mu\text{l}$
Oligonucleótido	3.2 pmolas
$\text{H}_2\text{O}$ estéril cbp	20 $\mu\text{l}$

La mezcla de reacción se colocó en un termociclador Gene Amp 2600 PE y se procedió a la amplificación de la secuencia como sigue: 25 ciclos a  $96^\circ\text{C}/10$  seg,  $50^\circ\text{C}/5$  seg y  $60^\circ\text{C}/4$  min. Se procedió a la purificación del producto amplificado mediante columnas de filtración en gel (*Spin Columns*).

### **Purificación del producto de secuenciación por columnas de filtración en gel (*Spin Columns*)**

La columna (Centrisep) se colocó sobre su base y se le retiró la tapa. Se reconstituyó el gel (sefarosa G-50 de grano medio) en 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, se tapó la columna y se invirtió varias veces, evitando la formación de burbujas. Se

dejó reposar 30 min a temperatura ambiente antes de usarse. Una vez que el gel sedimentó, se destapó la columna, se retiró de su base y se colocó sobre un microtubo para drenar el exceso de líquido. La columna se centrifugó a 3000 rpm durante 3-4min para eliminar el fluido intersticial. Se colocó en un microtubo colector estéril y etiquetado. Se aplicaron 20  $\mu$ l del producto de PCR sobre la sefarosa de la columna, sin tocar las paredes o dañar el gel. Finalmente se centrifugó la columna con el tubo colector a 3000 rpm durante 6min. Se guardó la muestra purificada en el tubo colector y se desechó la columna utilizada.

La muestra purificada se secó al vacío a temperatura ambiente. Se resuspendió en 12  $\mu$ l de amortiguador de carga TSR (test-supressor-reagent). Se mezcló por vórtex y se centrifugó brevemente. La muestra se desnaturalizó mediante calentamiento a 95°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo hasta el momento de aplicarla en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310.

## RESULTADOS

### Análisis Mutacional

En la región codificante del gen *CBFA1* se identificaron dos nuevas mutaciones, la primera en el exón uno y la segunda en el exón siete. Además se observaron tres polimorfismos, ninguno de los cuales había sido descrito.

#### Caso 1

El análisis secuencial de los ocho exones del gen *CBFA1* reveló una mutación heterocigota de sentido equivocado en el exón 1, dentro del dominio Q/A (158 A→T [Q53L]), que da en consecuencia un reemplazo de la glutamina 53 por una leucina.

#### Caso 2

Se identificó una mutación de codón de terminación posterior al motivo VWRPY. Esta mutación poco común (1565 G→C[X522Y]) cambia la señal de paro (UAG) por una tirosina (UAC) llevando teóricamente a una continuación de la traducción de 23 tripletes en la región no codificante 3', hasta que se encuentra el siguiente codón de terminación.

### Polimorfismos

Se detectaron tres nuevos polimorfismos. Uno de ellos se localizó en el exón 1, dentro del dominio Q/A, donde se observó que ocurre una transición silenciosa de A→G en el DNA de ambos pacientes y en todos los controles (240 A→G[P80P]). El segundo se identificó en el exón 6 en el paciente B y en un DNA control quienes portaban un cambio C→T en el nucleótido 1038 (1038 C→T[A346A]). Finalmente, la tercera mutación silenciosa fue encontrada en todos



pacientes y controles (15557 A→G[T519T]), consistente en un cambio A→G en la región C-terminal del dominio PST.

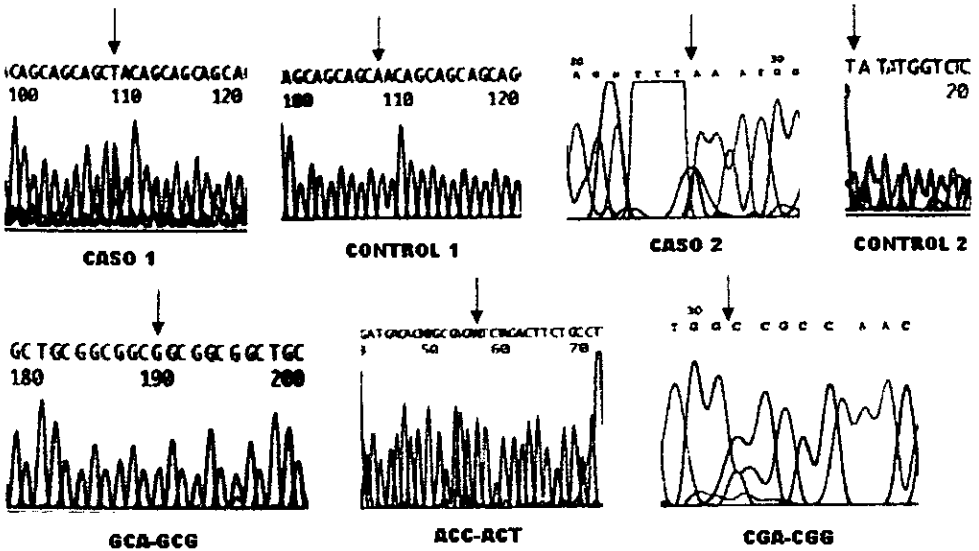


Fig. C. Arriba: en el caso 1 se observa la secuencia sentido del exón 1, donde se aprecia la mutación de sentido equivocado CAA→CTA. En el caso 2 se presenta la cadena antisentido del exón 7, la flecha señala la sustitución TGA→TCA. A la derecha se muestran sus respectivos controles. Abajo: se señalan los 3 polimorfismos descritos en los exones 1, 6 y 7 de izquierda a derecha.

## DISCUSIÓN

Los datos encontrados en estudios moleculares anteriores del gen *CBFA1* (Tablas 2-8), han demostrado que la mayoría de los pacientes con fenotipo clásico de DCC son portadores de mutaciones de sentido equivocado, que afectan el dominio Runt y por lo tanto, la capacidad de unión al DNA del factor de transcripción codificado. (Lee et al, 1997; Mundlos et al, 1997; Quack et al, 1999; Zhang et al, 2000). Sin embargo, en este estudio se describen dos pacientes con fenotipo clásico de DCC que presentan mutaciones en los exones extremos del gen (uno y siete).

En ambos casos, no fue posible realizar el análisis molecular del DNA de los familiares en primer grado, sin embargo, fueron valorados clínicamente en búsqueda de cualquier manifestación de DCC no encontrándose evidencia de ésta. Por lo anterior se podría inferir que ambas mutaciones ocurrieron *de novo* en los casos índice.

En el caso 1, se encontró una mutación de sentido equivocado en el dominio Q/A (158 A→T [Q53L]). Esta mutación yace dentro de un tracto que normalmente consta de 28 residuos de glutamina seguido de una serie ininterrumpida de 17 residuos de alanina, junto al extremo N-terminal del dominio Runt. Este cambio consiste en el reemplazo de un aminoácido polar (glutamina 53), por uno no-polar (leucina). Es de suponerse que esta mutación lleve a la proteína a una pérdida del grupo amino de la glutamina, que normalmente puede actuar como un buen aceptor de electrones para formar puentes de hidrógeno. Otra posible consecuencia sería que esta sustitución intercale un residuo no polar

dentro de un tracto polar de glutaminas altamente conservado a lo largo de la evolución y entre especies. En estudios previos se ha visto que la proporción de residuos de glutamina parece ser más importante que la estructura completa en este tipo de dominios de activación (Turner et al, 1998). Por lo tanto, existe la posibilidad de que esta mutación de sentido equivocado afecte la función de activación del dominio Q/A. También se ha demostrado (Thirunavukkarasu et al, 1998) que dentro del dominio Q/A de la proteína silvestre, es el tracto de poliglutamina el que confiere la mayoría de las funciones de transactivación. Lo mismo ha sido observado en numerosos factores de transcripción (Gerber et al, 1994).

La mayoría de los dominios de activación de los factores de transcripción presentan una de tres estructuras típicas: (a) ácida (abundante en ácidos glutámico y aspártico); (b) rica en prolina, y (c) rica en glutamina, como es el caso del gen *CBFA1* (Winter et al, 1998; Turner et al, 1998). Dada su importancia, es de esperarse que una disrupción heterocigota en *CBFA1* que afecte su dominio de activación Q/A, pueda comprometer la función biológica de esta proteína, es decir, llevar a una alteración en la diferenciación de los osteoblastos.

En el paciente 2 se demostró una mutación del codón de paro (1565 G→C[X522Y]) en el dominio PST codificado por el exón siete de *CBFA1*. Debido a esta substitución, la traducción de la proteína teóricamente acabará en el siguiente triplete de terminación que se encuentre en fase dentro del marco de lectura. Este corrimiento conlleva a la síntesis de una proteína más larga con 23 aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal.

Las mutaciones de codón de paro son muy raras y se sabe poco acerca de su expresión *in vivo* e *in vitro*. Uno de los ejemplos mejor estudiados es el de la  $\alpha$ -talasemia, de la cual se ha descrito una familia de cinco variantes de la cadena  $\alpha$  de la hemoglobina. Todas ellas difieren en la posición 142 al presentar diferentes sustituciones de bases en el codón de terminación (Weatherall et al, 1975). El mecanismo por el cual estas mutantes causan  $\alpha$ -talasemia aún no ha sido elucidado, pero es probable que el mRNA sea inestable, debido a una transcripción inapropiada de una secuencia en la región 3' no traducida, como ha sido postulado para Hb CONSTANT SPRING, una variante de esta familia (Weiss et al, 1995; Scriver et al, 2001).

Otra mutación de codón de terminación ha sido descrita en la Picnodisostosis (X330W), un error innato en la degradación de la matriz ósea debido a una actividad deficiente de la proteasa lisosomal Catepsina K. El defecto enzimático reduce la capacidad de los osteoclastos para remover la matriz orgánica, lo que causa una remodelación y crecimiento óseo inadecuados. Esta entidad patológica comparte algunas manifestaciones clínicas con la DCC (Scriver et al, 2001). En el análisis de expresión de la mutante (X330W) no se reconocieron niveles detectables de la molécula de Catepsina K, a pesar de la presencia de un nivel constante de transcritos (Gelb et al, 1996). Los autores sugirieron que la proteína mutante era altamente inestable (Weiss et al, 1995; Hunt et al, 1982).

Quack y colaboradores describieron un paciente con un fenotipo DCC particularmente severo, con fragilidad ósea y osteoporosis, causado por una

mutación de corrimiento de marco de lectura en *CBFA1*, la cual condujo a la generación de un producto proteico con 87 residuos adicionales. Los autores propusieron dos posibilidades: 1) que la proteína mutada pudiera actuar en una forma dominante negativa por medio de su unión al promotor del gen blanco, sin ser capaz de activar o reprimir, o alternativamente 2) que los 87 aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo-terminal pudieran proveer nuevas capacidades represoras a la proteína *CBFA1*(Quack et al, 1999).

Todos los ejemplos anteriores son mutaciones que resultan en ausencia de una proteína funcional, ya sea por inestabilidad del RNA mensajero o de la proteína, o por un efecto dominante negativo de la proteína mutada. Estudios de expresión específicos para la mutación de codón de paro encontrada en este estudio, permitirían confirmar el mecanismo patológico que actúa en este caso.

El espectro fenotípico de la DCC ha sido recientemente ampliado por los análisis de las mutaciones segregadas en forma familiar. Actualmente, se puede considerar que el cuadro clínico incluye un amplio espectro fenotípico que puede ir desde un fenotipo dental aislado hasta las formas severas de la enfermedad. Tomando en cuenta la expresividad variable de esta patología, se debe hacer una valoración completa de los pacientes con DCC así como de sus familiares de primer grado, con el fin de otorgar un asesoramiento genético adecuado.

Este es el primer estudio realizado en el gen *CBFA1* en pacientes mexicanos, por lo que en el futuro puede ser ampliado captando un mayor número de pacientes y determinando la frecuencia de este padecimiento en nuestra población. También pueden realizarse ensayos de expresión para comprobar las consecuencias de las mutaciones encontradas.

El esqueleto está compuesto de múltiples elementos de diversos orígenes, la mayoría de los cuales están formados por dos tejidos, cartílago y hueso y cada uno de ellos tiene sus propios elementos celulares: el condrocito en el cartílago y el osteoblasto y osteoclasto en el hueso. Finalmente, cada uno de estos tipos celulares tiene su propia vía de diferenciación, sus funciones fisiológicas y, por lo tanto, sus patologías. Una característica del hueso reside en su fisiología. La resorción ósea, llevada a cabo por el osteoclasto, ocurre a lo largo de toda la vida en individuos saludables y ocasionalmente durante la reparación de fracturas, y se encuentra en balance con la formación ósea *de novo* en el proceso que llamamos remodelación.

Recientemente, se ha comenzado a entender a nivel molecular el control de la resorción ósea y es muy posible que el estudio de la función del gen *CBFA1* permita un mejor esclarecimiento. También queda para investigaciones posteriores el estudio de la regulación de la expresión de *CBFA1*, si puede ser farmacológicamente controlada y si esto tendría implicaciones terapéuticas, por ejemplo en la osteoporosis, la cual podría ser tratada por estimulación de la formación ósea.

## ANEXO 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ otorgo mi consentimiento para que me sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación "**Análisis de Mutaciones en el gen CBFA1 en pacientes con Displasia Cleidocraneal.**" Se me ha explicado que mi enfermedad, llamada Displasia Cleidocraneal, es causada por una alteración genética que ocasiona un desarrollo anormal de los huesos y que por medio de estudios en mi material genético se pueden conocer las alteraciones que dieron origen a mi padecimiento. Además, estos estudios pueden reconocer personas en mi familia con riesgo de heredar la enfermedad a sus hijos. Se me ha explicado con detenimiento que mi participación consiste en que me sean extraídos con jeringa 3 ml de sangre venosa, procedimiento que no ocasionará molestias mayores. Además se me ha asegurado que la información obtenida en este estudio y relacionada con mi patrimonio genético no será divulgada ni usada para otros fines que no sean los establecidos en el proyecto de investigación mencionado.

#### ATENTAMENTE

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Médico \_\_\_\_\_ Responsable \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_ 1 \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## ANEXO 2

### BASES DE DATOS ELECTRÓNICAS

- GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>. (Accession numbers AF001443-AF001450).
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 119602, 118980, 265800, 248370, 188550, 216340, 125350, 175100: agosto, 2001. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Pub Med. National Library of Medicine. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/>.
- Frontiers in Bioscience. <http://www.bioscience.org/vitalink.htm>.
- Geneatlas: Gene Database. <http://bisance.citi2.fr/cgi-bin/fiche?DISD=1&SYMB=RUNX2>.
- Genecards (Weizmann). <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.html>.
- HGNC. HUGO Gene Nomenclature Committee. <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>.
- Swiss-Prot. <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>.
- HGMD. Human Gene Mutation Database. <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alliston T, Choy L, Ducky P, Karsenty G, Derynk R. TGF- $\beta$ -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001; 20:2254-72.
- Arvystas, M. G. Familial generalized delayed eruption of the dentition with short stature. *Oral Surg.* 1976; 41: 235-243.
- Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 1996: 51-68.
- Bae SC, Ogawa E, Maruyama M, Oka H, Satake M, Shigesada K, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Ito Y. PEBP2 alpha B/mouse AML1 consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials. *Mol Cell Biol* 1994; 14:3242-52.
- Bae SC, Takahashi E, Zhang YW, Ogawa E, Shigesada K, Namba Y, Satake M, Ito Y. Cloning, mapping and expression of PEBP2-alpha-C, a third gene encoding the mammalian Runt domain. *Gene* 1995; 159:245-8.
- Bae SC, Yamaguchi-Iwai Y, Ogawa E, Maruyama M, Inuzuka M, Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y. Isolation of PEBP2 $\alpha$ B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1. *Oncogene* 1993; 8:809-814.

- Banerjee C, Hiebert SW, Stein JL, Lian JB, Stein GS. An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4968-73.
- Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J Cell Biochem* 1997; 66:1-8.
- Becker A, Lustmann J, Shteyer A. Cleidocranial dysplasia. Part 2. Treatment protocol for the orthodontic and surgical modality. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:173-83.
- Becker A, Shteyer A, Bimstein E, Lustmann J. Cleidocranial dysplasia. Part 1. General principles of orthodontic and surgical treatment modality. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:28-33.
- Bick, EM. The classic: on hereditary cleido-cranial dysostosis (transl.). *Clin Orthop*. 1968; 58: 5-7.
- Brueton LA; Reeve A; Ellis R; Husband P; Thompson EM; Kingston HM. Apparent cleidocranial dysplasia associated with abnormalities of 8q22 in three individuals. *Am J Med Genet* 1992; 43: 612-618.
- Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985; 31:164-5.
- Cole WR, Levine S. Cleidocranial Dysostosis. *Br J Radiol* 1951; 24:549-55.

- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* 1993; 117:409–29. .
- Crouzon O, Buttier H. Sur une forme particulier de la dysostosis cléidocrânienne de Pierre Marie et Sainton (forme cleido-cranio-pelvienne). *Bull Mem Soc Dilala Hop* 1921; 45:972-1099.
- Cuevas-Covarrubias SA, Maya-Nuñez G, Kofman-Alfaro S. A modified quick method for DNA extraction from leucocytes 1998; enviado a publicación.
- Chitayat D; Hodgkinson KA; Azouz EM. Intrafamilial variability in cleidocranial dysplasia: a three generation family. *Am J Med Genet* 1992;42:298-303.
- D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. 1999. *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126: 2911–2920.
- Daga A, Kariovich CA, Dumstrei K, Banerjee U. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by lozenge, which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* 1996; 10:1194–1205.
- Desbois C, Hogue DA, Karsenty G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 1994; 269:1183–90.
- Dhem A, Goret-Nicaise M, Dambrain R, Nyssen-Behets C, Lengele B, Manzanares MC. Skeletal growth and condroid tissue. *Arch Ital Anat Embriol* 1989; 94:237.

- Dore, DD; MacEwen, GD; Boulos, MI. Cleidocranial dysostosis and syringomyelia: review of the literature and case report. *Clin Orthop Rel Res* 1987; 214: 229-234.
- Ducky P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382:448–52.
- Ducky P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1858–69.
- Ducky P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999; 13:1025–36.
- Ducky P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747–54.
- Ducky P. *Cbfa1*: A Molecular Switch in Osteoblast Biology. *Dev Dyn* 2000; 219:461-71.
- Dzedzic-Goclawska A, Emerich J, Grzesik W, Stachowicz W, Michalik J, Ostrowski K. Differences in the kinetics of the mineralization process in endochondral and intramembranous osteogenesis in human fetal development. *J Bone Miner Res* 1988; 3:533.
- Feldman GJ, Robin NH, Brueton LA. A gene for cleidocranial dysplasia maps to the short arm of chromosome 6. *Am J Hum Genet* 1995; 56:938-43.

- Francke U, Weber F, Sparkes RS, Mattson PD, Mann J. Duplication 11(q21-23qter) syndrome. *Birth Defects* 1977; 13:167-86.
- Gelb BD, Cooper E, Shevell M, Desnick RJ. Genetic mapping of the cleidocranial dysplasia (CCD) locus on chromosome band 6p21 to include a microdeletion. *Am J Med Genet* 1995; 58:200-5.
- Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodisostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 1996; 273:1236.
- Geoffroy V, Corral DA, Zhou L, Lee B, Karsenty G. Genomic organization, expression of the human CBFA1 gene, and evidence for an alternative splicing event affecting protein function. *Mamm Genome* 1998; 9:54-7.
- Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 1994, 263:808-11.
- Goodman RM, Tadmor R, Zaritsky A, Becker SA. Evidence for an autosomal recessive form of cleidocranial dysostosis. *Clin. Genet.* 1975; 8:20-29.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. Syndromes affecting bone: other skeletal disorders. En: *Syndromes of the Head and Neck*. 3<sup>rd</sup>. ed. Oxford University Press, 1990:249-53.
- Graff JM. *Cell* 1997; 89:171-4.
- Hall BD. Syndromes and situations associated with congenital clavicular hypoplasia or agenesis. En: Papadatos CJ, Bartsocas CS, Eds. *Skeletal dysplasias*. New York: Alan R Liss; 1982:279-88.

- Hall BK, Miyake T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol* 1992; 186:107–124.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69:990–1046.
- Hitchin AD. Cementum and other root abnormalities of permanent teeth in cleidocranial dysostosis. *Br Dent J* 1975; 139:313-18.
- Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10:1580-94.
- Horton WA. Morphology of connective tissue: cartilage, connective tissue, and its heritable disorders. New York: Wiley-Liss Inc.; 1993:73–84.
- Huang LF, Fukai N, Selby PB, Olsen BR, Mundlos S. Mouse clavicular development: analysis of wild-type and cleidocranial dysplasia mutant mice. *Dev Dyn* 1997; 210:33–40.
- Hunt DM, Hicks DR, Winichagoon P, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin Constant Spring has an unstable  $\alpha$ -chain messenger RNA. *Br J Haematol* 1982; 51:405.
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev Dyn* 1999; 214:279–90.

- Jackson WPU. Osteo-dental dysplasia (cleido-cranial dysostosis). The "Arnold Head". *Acta Med Scand* 1951; 139:292-307.
- Jarvis JL, Keats TE. Cleidocranial dysostosis. A review of 40 new cases. *AJR* 1974; 121:5-16.
- Jensen BL, Kreiborg S. Craniofacial abnormalities in 52 school-age and adult patients with cleidocranial dysplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1993; 13:98-108.
- Jensen BL, Kreiborg S. Craniofacial growth in cleidocranial dysplasia – a roentgencephalometric study. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1995; 15:35-43.
- Jensen BL, Kreiborg S. Dental treatment strategies in cleidocranial dysplasia. *Br Dent J* 1992; 172:243-7.
- Jensen BL, Kreiborg S. Development of the dentition in cleidocranial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 1990; 19:89-93.
- Jensen BL. Somatic development in cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 1990; 35:69-74.
- Ji C, Casinghino S, Chang DJ, Chen Y, Javed A, Ito Y, Hiebert SW, Lian JB, Stein GS, McCarthy TL, Centrella M. CBFA1 (AML/PEBP2)-related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1998; 69:353–63.
- Jiménez MJ, Balbin M, López JM, Alvarez J, Komori T, López-Otin C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999; 019:4431–42.

- Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P. The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 1993; 9:338–341.
- Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y, Shigesada K. 1990. Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J Virol* 10:4808–4819.
- Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, Gergen JP. The *Drosophila* segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev* 1990; 4:1701-13.
- Kempfle B. Dysostosis cleidocranialis. *Dtsch Zahnartz Z* 1965; 20:1364-9.
- Kempter B, Grossbadern K. A quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 1992; 8:226-30.
- Kim IS, Otto F, Abel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev* 1999; 80:159–70.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89:755–64.
- Kontges G, Lumsden A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 1996; 122:3229–42.



- Lechelle P; Thevenard A; Mignot H. Dysostose cleido-cranienne avec malformations vertebrales multiples et troubles nerveux: caractere familial des malformations. Bull Mem Soc Med Hop Paris 1936; 52:1526-1530.
- Lee D, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy W, Ducy P, Karsenty G. Missense mutations abolishing DNA binding of osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. Nature Genet 1997; 16:307-10.
- Lemonnier J, Delannoy P, Hott M, Lomri A, Modrowski D, Marie PJ. The Ser252Trp fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) mutation induces PKC-independent downregulation of FGFR-2 associated with premature calvaria osteoblast differentiation. Exp Cell Res 2000; 256:158-67.
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. Genomics 1994; 23: 425-432.
- Levin EJ, Sonnenschein H. Cleidocranial dysostosis. N Y State J Med 1963; 63:1562-6.
- Liu P, Tarle SA, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF $\beta$ /PEBP2 $\beta$  and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. Science 1993; 261:1041-4.
- Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science 1997; 278:1059-65.

- Lu J, Maruyama M, Satake M, Bae SC, Ogawa E, Kagoshima H, Shigesada K, Ito Y. Subcellular localization of the a and b subunits of the acute myeloid leukemia-linked transcription factor PEBP2/CBF. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1651-61.
- Lukinmaa PL, Jensen BL, Thesleff I, Andreasen JO, Kreoborg S. Histological observations of teeth and periodontal tissues in cleidocranial dysplasia imply increased activity of odontogenic epithelium and abnormal bone remodeling. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1995; 15:212-21.
- Marie P, Sainton P. Sur la dysostose cléido-crânienne héréditaire. *Rev Neurol* 1898; 6:293-5.
- Marks SC, Hermey DC: The structure and development of bone. En: *Principles of Bone Biology*. Edited by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. London: Academic Press; 1996:3-14.
- Martin. Sur un déplacement naturel de la clavicle. *J Med Chir Pharmacol* 1765; 23:456-60.
- Merriman HL, van Wijnen AJ, Hiebert S, Bidwell JP, Fey E, Lian J, Stein J, Stein GS. The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the MAL/CBF/PEBP2/Runt domain transcription factor family. *Biochemistry* 1995; 34:13125-32.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriología Clínica*. México, D.F.: W.B. Saunders Company; 1993:378-95.

- Mundlos S, Mulliken JB, Abramson DL, Warman ML, Knoll JH, Olsen BR. Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum Mol Genet* 1995; 4:71–5.
- Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part I. Molecular insights into skeletal development - transcription factors and signaling pathways. *FASEB J* 1997; 11:125-32.
- Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part II. Molecular insights into skeletal development - matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 1997; 11:227-33.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albrigh S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JHM, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;89:73-9.
- Mundlos S. Cleidocranial Dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 1999; 36:177-82.
- Nakai H, Yamamoto Y, Kuroki Y. Partial trisomy of 11 and 22 due to familial translocation t(11;22) (q23;q11), inherited in three generations. *Hum Genet* 1979; 51:349-55.
- Nienhaus H, Mau U, Zang KD, Henn W. Pericentric inversion of chromosome 6 in a patient with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 1993; 46:630-1.
- Nucifora G, Begy CR, Erickson P, Drabkin HA, Rowley JD. The 3;21 translocation in myelodysplasia results in a fusion transcript between the

AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7784-8.

- Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel *Drosophila* runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* 1993; 194:314-31.
- Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a new family of transcription factor homologous to the products of the *Drosophila* runt and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:6859-63.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocation in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84:321-30.
- Opperman L. Cranial Sutures as Intramembranous Bone Growth Sites. *Developmental Dynamics* 2000; 219:472-85.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765-71.
- Palmer CG, Bader P, Slovak ML, Comings DE, Pattenati MI. Partial deletion of chromosome 6p: delineation of the syndrome. *Am J Med Genet* 1991; 39:155-60.

- Porte D, Tuckermann J, Becker M, Baumann B, Teurich S, Higgins T, Owen MJ, Schorpp-Kistner M, Angel P. Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene* 1999; 18:667-78.
- Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, Lee PJ, Majewski FR, Mulliken JB, Suri M, Zenker M, Mundlos S, Otto F. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1268-78.
- Ramesar RS, Greenberg J, Martin R, Goliath R, Bardien S, Mundlos S, Beighton P. Mapping of the gene for cleidocranial dysplasia in the historical Cape Town (Arnold) kindred and evidence for locus homogeneity. *J Med Genet* 1996; 33:511-4.
- Ramesar RS; Greenberg, J; Martin, R; Goliath, R; Bardien, S; Mundlos, S; Beighton, P. Mapping of the gene for cleidocranial dysplasia in the historical Cape Town (Arnold) kindred and evidence for locus homogeneity. *J Med Genet* 1996; 33: 511-514.
- Rawls A, Olson EN. *Cell* 1997; 89:5-8.
- Reddi AH. *Cytokine Growth Factor Review*. 1997; 8:11-20.
- Reed MH; Houston CS. Abnormal ossification of the hyoid bone in cleidocranial dysplasia. *Canad Assoc Radiol J* 1993; 44:277-279.
- Rimoin DL. International nomenclature or constitutional diseases of bone. *J Pediatr* 1978; 93:614-18.
- Rodan GA, Harada S. The missing bone. *Cell* 89: 677-680, 1997.

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
- Satake M, Nomura S, Yamaguchi-Iwai Y, Takahama Y, Hashimoto Y, Niki M, Kitamura Y, Ito Y. Expression of the Runt domain-encoding PEBP2 alpha genes in T cells during thymic development. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1662-70.
- Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. Vol. III McGraw-Hill 2001:4582-3, 4605.
- Scheuthauer G. Kombination rudimentärer Schlüsselbeine mit Anomalien des Schädels beim erwachsenen Menschen. *Allg Wien Med Ztg* 1871; 16:293-5.
- Schinzel A. Trisomy 20pter-q11 in a malformed boy from a t(13;20)(p11;q11) translocation carrier mother. *Hum Genet* 1980; 53:169-72.
- Schuch P, Fleischer-Peters A. Zur Klinik der Dysostosis cleidocranialis. *Z Kinderheilkd* 1967; 98:107-32.
- Selby PB, Selby PR. Gamma-ray-induced dominant mutations that cause skeletal abnormalities in mice: II. Description of proved mutations. *Mut Res* 1978; 51:199-236
- Sillence DO, Ritchie HE, Selby PB. Animal model: skeletal anomalies in mice with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 1987; 27:75–85.
- Speck NA, Stacy T. A new transcription factor family associated with human leukemias. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1995; 5:337–364.

- Stifani, S, Blaumueller SS, Redhead CM, Hill NJ, Artavanis-Tsakonas S. Human homologs of a *Drosophila* enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 1992; 2:119-27.
- Stocks P, Barrington A. Cleidocranial dysostosis. En: *The treasury of human inheritance*. Vol. III, parte 1. London: Cambridge University Press, 1981:121-39.
- Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:844-50.
- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997; 67:111-23.
- Thirunavukkarasu K, Mahajan M, McLarren KW, Stifani S, Karsenty G. Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1* contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with *Cbfb*. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4197-08.
- Thornell A, Hallberg B, Grundström T. Differential protein binding in lymphocytes to a sequence in the enhancer of the mouse retrovirus SL3-3. *Mol Cell Biol* 1988;8:1625-37.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by *PPAR $\gamma$ 2*, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79:1147-56.
- Towler DA, Bennet CD, Rodan GA. Activity of the rat osteocalcin basal promoter in osteoblastic cells is dependent upon homeodomain and CP1 binding motifs. *Mol Endocrinol* 1994; 8:614-24.

- Turner PC, McLennan AG, Bates AD, With MRH. Instant Notes in Molecular Biology. Springer-Verlag New York: Bios Scientific Publishers;1997:207-12.
- Weiss IM, Liebhaber SA. Erythroid cell-specific determinants of  $\alpha$ -globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 1995;15:2457-65.
- Wang Q, Stancy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:3444-9.
- Wang S, Speck NA. Purification of core-binding factor, a protein that binds the conserved core site in murine leukemia virus enhancers. *Mol Cell Biol* 1992; 12:89-102.
- Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13:3324-39.
- Warren AJ, Bravo J, Williams RL, Rabbits TH. Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBF $\beta$ . *EMBO J* 2000; 19:3004-15.
- Weatherall DJ, Clegg JB. The  $\alpha$  chain termination mutants and their relationship in thalassaemia. *Philos Trans R Soc Lond (B)* 1975; 271:411.
- Webster MK, Donoghue DJ. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet* 1997; 13:178–82.
- Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993; 75:1241-4.



- Weiss IM, Liebhaber SA. Erythroid cell-specific determinants of  $\alpha$ -globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 1995;15:2457-65.
- Wijmenga C; Speck NA; Dracopoli NC; Hofker MH; Liu P; Collins FS. Identification of a new murine runt domain-containing gene, *Cbfa3*, and localization of the human homolog, *CBFA3*, to chromosome 1p35-pter., *Genomics* 1995; 26:611-4.
- Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. *Instant Notes in Genetics*. Springer-Verlag New York: Bios Scientific Publishers;1998:56-61.
- Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, *Cbfa1*. *J Biol Chem* 2000; 275:4453-9.
- Zackai EH; Robin NH; McDonald-McGinn DM. Sibs with cleidocranial dysplasia born to normal parents: germ line mosaicism? *Am J Med Genet* 1997; 69:348-351.
- Zhang Y-W, Bae SC, Takahashi E, Ito Y. The cDNA cloning of the transcripts of human *PEBP2-alpha-A/CBFA1* mapped to 6p12.3-p21.1, the locus for cleidocranial dysplasia. *Oncogene* 1997; 15:367-71.
- Zhang Y-W, Natsuo Y, Kakazu N, Abe T, Takada K, Imai S, Sato M, Nomura S, Ochi T, Okuzumi S, Nogami H, Nagai T, Ohashi H, Ito Y. *PEBP2 $\alpha$ /CBFA1* mutations in Japanese cleidocranial dysplasia patients. *Gene* 2000; 21-28.
- Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, Gelb BD, Pirinen S, Berry SA, Greenberg CR, Karsenty G, Lee B. *CBFA1*

mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Hum Molec Genet* 1999; 8:2311-2316.

- Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX. A Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Molec Genet* 2000; 9:2001-8.