

## INVESTIGACIÓN ORIGINAL

## Análisis genotípico de 11 pacientes colombianos con Síndrome de Apert

*Genotypic analysis of 11 Colombian Apert syndrome patients*

Harvy M. Velasco<sup>1</sup> • Diana Ramírez<sup>2</sup> • Tatiana Pineda<sup>3</sup> • Lorena Piñeros<sup>4</sup> • Tatiana Vinasco<sup>5</sup> • Gustavo Contreras<sup>6</sup> • Clara E. Arteaga<sup>7</sup> • Alejandro Giraldo<sup>8</sup>

Recibido: 13/01/2013 / Aceptado: 25/03/2013

<sup>1</sup> Profesor asistente, Facultad de Medicina, Universidad Nacional. Grupo de investigación en Genética Clínica.

<sup>2</sup> Médico interno, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Grupo de investigación en Genética Clínica.

<sup>3</sup> Médico interno, Facultad de Salud, Universidad del Valle.

<sup>4</sup> Estudiante Maestría en genética humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional\*. Grupo de investigación en Genética Clínica.

<sup>5</sup> Estudiante Maestría en genética humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional\*. Grupo de investigación en Genética Clínica.

<sup>6</sup> Profesor Asistente, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander.

<sup>7</sup> Profesor asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional. Grupo de investigación en Genética Clínica.

<sup>8</sup> Profesor asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional. Grupo de investigación en Genética Clínica.

Correspondencia: hmvelascop@unal.edu.co

### | Resumen |

**Antecedentes.** El síndrome de Apert (SA) es una de las craniostenosis sindrómicas más severas que afecta el neuro y viscerocraneo y además presenta alteraciones multisistémicas con repercusiones en aspectos físicos (aspecto general y talla baja), sensoriales (hipoacusia y trastornos visuales), cognoscitivos (retardo mental o trastornos del aprendizaje) y de inclusión laboral (sindactilia severa en manos y pies). Su etiología es la mutación del receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR2) y se hereda de forma autosómica dominante.

**Materiales y métodos.** Se analizaron clínica y molecularmente 11 pacientes con sospecha de SA. Se realizó estudio mutacional mediante RFLP para el gen FGFR2.

**Resultados.** Se confirmaron molecularmente los 11 pacientes con SA, cuyas edades oscilaron desde los 0 a 32 años. Todos los pacientes presentaron el fenotipo clásico. Se encontró un 63.6% de pacientes con la mutación S252W y 36.4% con P253R.

**Discusión.** De los pacientes analizados, llamó la atención la presencia de talla baja y RM/RGD en algunos de ellos. Desde

el punto de vista genotípico, las frecuencias mutacionales para S252W y P253R no mostraron diferencias con relación a lo reportado mundialmente. Aunque no se disponen de datos de la incidencia de esta patología a nivel local, este estudio podría ser el primer acercamiento para fines epidemiológicos en Colombia.

**Palabras clave:** Síndrome Apert, Colombia, S252W, P253R (DeCS).

Velasco HM, Ramírez D, Pineda T, Piñeros L, Vinasco T, Contreras G, Arteaga CE, Giraldo A. Análisis genotípico de 11 pacientes colombianos con Síndrome de Apert. Rev. Fac. Med. 2013; 61: 35-40.

### Summary

**Background.** Apert Syndrome (AS) is one of the most severe syndromic craniosynostosis affecting neuro and viscerocranial and presenting with multisystemic anomalies altering physical aspects (general looks and short stature), sensorineural aspects (deafness and visual problems), cognitive development (mental retardation or trouble learning) and work inclusion (severe syndactyly in hands and feet). Its

aetiology relies on mutation of the Fibroblast Growth Factor Receptor type 2 (FGFR2) gene, inherited by an autosomal dominant path.

**Materials and methods.** 11 patients with suspicion of AS were clinically evaluated and molecularly tested for mutations in FGFR2 by RFLP.

**Results.** Patients with AS from 0 to 32 years old were analyzed for mutations in FGFR2 gene. All of them had the classical phenotype of the disease. 63.6% of the patients had the S252W mutation while 36.4% had the P253R mutation.

**Discussion.** Of all patients enrolled in this study it is noteworthy that some of them had short stature, while others had mental retardation or global development delay. Mutational frequencies for S252W and P253R did not show difference according to what has been reported worldwide. Although there is no data about the incidence of this disease locally, this study could be a first approach to its epidemiology in Colombia.

**Key words:** Apert Syndrome, Colombia, FGFR2, S252W, P253R (MeSH).

Velasco HM, Ramírez D, Pineda T, Piñeros L, Vinasco T, Contreras G, Arteaga CE, Giraldo A. Genotypic analysis of 11 Colombian Apert syndrome patients. Rev. Fac. Med. 2013; 61: 35-40.

## Introducción

El Síndrome de Apert (SA) o Acrocefalosindactilia tipo I (MIM #101200) es un desorden congénito, de origen genético, con herencia autosómica dominante, descrito por primera vez por Eugene Apert y caracterizado por craneosinostosis coronal, sindactilia simétrica de las cuatro extremidades y malformaciones craneofaciales (1). Este síndrome es considerado como una de las formas más severas de craneosinostosis, dado su compromiso multisistémico, que incluye anomalías en Sistema Nervioso Central, alteraciones esqueléticas y viscerales.

Es causado por las mutaciones recurrentes S252W y P253R en el gen del Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR2), las cuales se ubican en dos aminoácidos adyacentes del dominio extracelular de unión al ligando (FGFs), produciendo una ganancia de función de la vía, lo cual promueve una aberrante diferenciación y proliferación a nivel de los osteoblastos de las suturas craneales (2,3).

Este síndrome representa el 4,5% de todas las craneosinostosis sindrómicas y tiene una incidencia calculada en 1:60.000 recién nacidos vivos, siendo más común en ciertas regiones geográficas como Asia, con incidencias de hasta 2:10.000. (4,5). En Colombia no existen estadísticas formales acerca de la incidencia o prevalencia de este síndrome en la población. A continuación se presenta el análisis genotípico de una muestra de 11 pacientes no relacionados remitidos al Instituto de Genética de la Universidad Nacional con diagnóstico clínico de esta entidad.

## Material y métodos

Previa firma del consentimiento informado, el cual fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional, se incluyeron 11 pacientes no relacionados con sospecha clínica de SA. Luego de una revisión clínica por parte de especialistas, se procedió a la toma de muestra de sangre periférica. Se realizó extracción de ADN mediante Kit Mo Bio y luego se realizó cuantificación de ADN mediante Nano drop. Se procedió a la amplificación de 467 pb del exón 7 empleando los primeros F5' - TGACAGCCTCTGACAACACAAC-3' y R 5'-GGAAATCAAAGAACCTGTGGC-3' bajo las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de denaturación inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de denaturación a 35 °C por 30 segundos; annealing a 62 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. El volumen de reacción fue de 25 µl ADN genómico a 50ng/25µl, Buffer 1X; 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTPs, 0.4µM primers F y R y 1.25U Taq ADN Polimerasa® (INVITROGEN). La visualización se realizó en geles de agarosa al 1.4% teñidos con SYBRsafe (INVITROGEN).

Para el análisis mutacional se emplearon las enzimas de restricción de la casa comercial Fermentas® (MboI para S252W y BglII para P253R) bajo las siguientes condiciones: Volumen de reacción de 15µl, Buffer 1X, 6µl de amplificado de PCR y 3U de enzima para incubación a 37°C a por 80 minutos. El revelado se llevó a cabo con geles de poliacrilamida al 9%, teñidos con SYBRsafe (INVITROGEN) y empleando el Hyperladder de 25bp (FERMENTAS).

## Resultados

Se confirmó la presencia de las 2 mutaciones en el gen FGFR2 para SA del total de 11 pacientes no relacionados con sospecha clínica. Las edades de los 11 pacientes diagnosticados

oscilaron entre los 0 meses a 32 años y su distribución por género fue de 7 hombres y 4 mujeres. Con relación a las medidas antropométricas, ninguno presentó microcefalia (datos no mostrados) y 3 pacientes presentaron una talla baja o en el límite inferior de aparición postnatal.

En cuanto a su fenotipo, todos tuvieron craneosinostosis coronal y sindactilias simétricas moderadas a severas (Figura

1). Desde el punto de vista del neurodesarrollo, uno de ellos tenía un diagnóstico confirmado de retardo mental severo, tres presentaban retardo mental leve, 4 no tenían antecedentes de RGD / RM y en los tres pacientes neonatos no se pudo evaluar dicho compromiso, aunque ninguno presentaba encefalopatía. Finalmente llama la atención el hallazgo de 6 pacientes con edades paternas mayores a los 33 años (Tabla 1).



**Figura 1.** Fenotipo de una paciente con SA incluida en el estudio: A nivel craneofacial: Tendencia al aplanamiento occipital, hipoplasia mediofacial, prognatismo. En extremidades: sindactilia simétrica. Nótese corrección quirúrgica nivel de manos y pulgares prominentes.

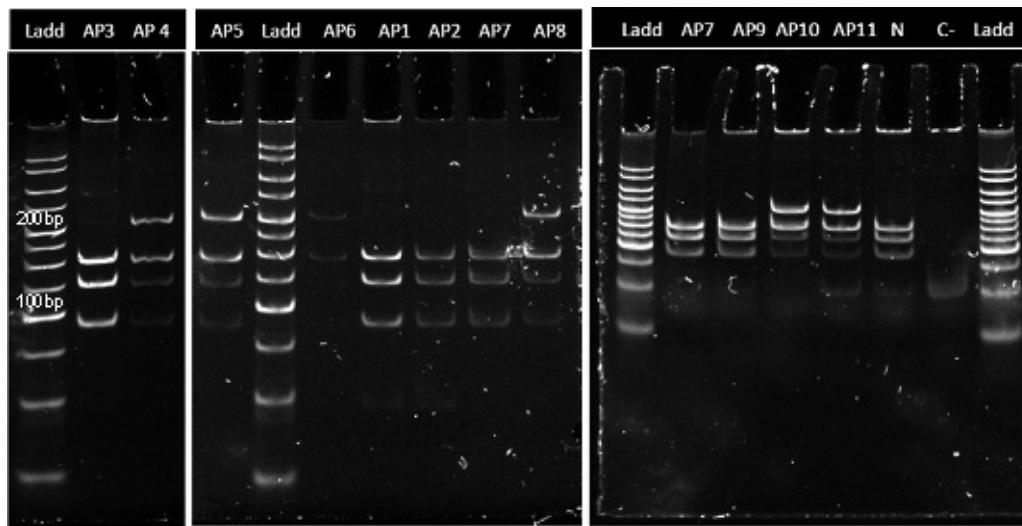
**Tabla 1.** Características clínicas y genotípicas de los pacientes.

Paciente	Género	Edad	DSM	Escolaridad	Origen	Edad paterna	Sindactilia	Talla (percentil)	Genotipificación
AP1	F	8 años	Normal	2º grado	Bogotá	33 años	Presente	116 cm(p5)	P253R
AP2	F	2 años 7m	Normal	NA	Bogotá	36 años	Presente	95 cm (p50)	P253R
AP3	M	30 años	Normal	Primaria	Pasto	36 años	Presente	158 cm (<p3)	S252W
AP4	F	32 años	Normal	Técnico	Bogotá	43 años	Presente	150 cm (p3)	S252W
AP5	M	RN	NA	NA	Bucaramanga	Sin datos	Presente	50 cm (p50)	S252W
AP6	M	8 años	RM leve	Preescolar	Villavicencio	38 años	Presente	122 cm (p5)	S252W
AP7	M	2 años	RM leve	NA	Bucaramanga	25 años	Presente	90 cm (p25)	P253R
AP8	M	RN	NA	NA	Bogotá	Sin datos	Presente	51 cm (p50)	S252W
AP9	M	3 años	RM severo	NA	Ubaté	25	Presente	91cm (p7)	P253R
AP10	M	5m	RM leve	NA	Córdoba	41	Presente	61cm (<p3)	S252W
AP11	F	RN	NA	NA	Bogotá	22	Presente	51 cm (p10)	S252W

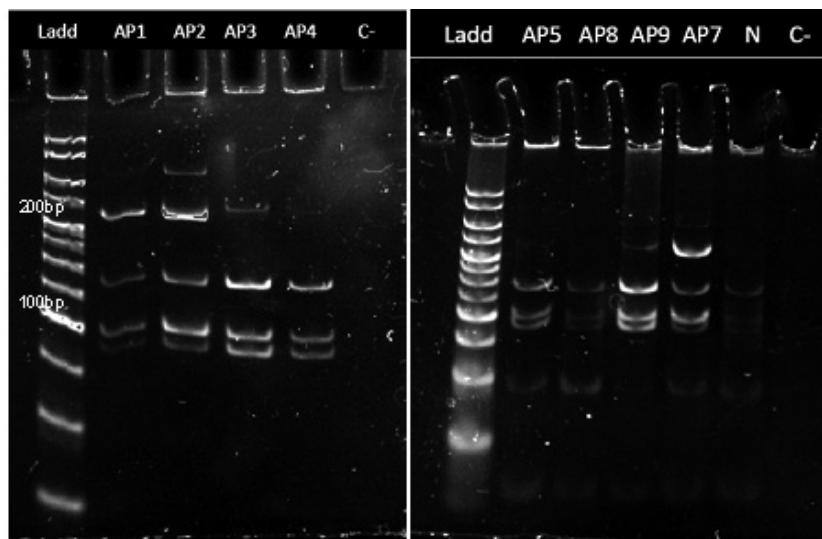
DSM: Desarrollo psicomotor, NA: No aplica, RM leve: Retardo del desarrollo leve. R severo: Retardo del desarrollo severo.

Desde el punto de vista genotípico, 7 pacientes presentaron la mutación S252W (63,6%) y en 4 pacientes se encontró la

mutación P253R (36,4%), lo cual concuerda con lo descrito en la literatura mundial (Tabla 1 y Figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Perfil de restricción en geles de poliacrilamida empleando la enzima MboI para la detección de la mutación S252W. Ladd: ladder (; AP: código del paciente; N: ADN de una personal sin el síndrome; C-: control de contaminación. Los pacientes con la mutación (AP3, AP4, AP5, AP6, AP8, AP10, AP11) muestran una banda en la parte superior del carril de aproximadamente 250bp (pares de bases) en contraste con los pacientes negativos para esa mutación.



**Figura 3.** Perfil de restricción en geles de poliacrilamida empleando la enzima BglII para la detección de la mutación P253R. Ladd: ladder; AP: código del paciente; N: ADN de una personal sin el síndrome; C-: control de contaminación. Los pacientes con la mutación (AP1, AP2, AP9, AP7) muestran una banda en la parte superior del carril de aproximadamente 300bp (pares de bases) en contraste con los pacientes negativos para esa mutación.

## Discusión

Dentro de los hallazgos fenotípicos clásicos del SA se encuentra craneosinostosis coronal, compromiso facial dismórfico, alteraciones acrales con sindactilias simétricas en manos y pies y compromiso visceral (1,6). Los pacientes incluidos en este estudio mostraron perímetros cefálicos dentro

de los límites de la normalidad, pero todos con craneosinostosis coronal asociado a facies compatibles con SA. Llamó la atención en este grupo, una tendencia hacia la talla baja de origen postnatal, con cerca del 27% de los pacientes en percentiles 3 o menores, tal como lo menciona la literatura, ya que estos pacientes presentan una desaceleración primaria antes de la adolescencia, ubicándolos en los p5 a 50 y luego

una desaceleración secundaria, la cual es más pronunciada con una tendencia hacia la rizomelia en miembros inferiores (7).

Al evaluar el neurodesarrollo en los pacientes con SA, la literatura menciona una frecuencia relativamente alta de déficit cognoscitivo, entre el 34-52% (8-10); en este estudio se reportaron 4 pacientes con RM / RGD, correspondiente al 36.4% semejante a lo reportado, aunque hay que tener precauciones con estos datos por el tamaño muestral y también por la presencia de Recién Nacidos en quien aun no se podía valorar dicho compromiso.

En 1995, un estudio con 40 pacientes con SA se encontró la presencia de las dos mutaciones relacionadas, la S252W y la P253R (11). Ambas mutaciones involucran cambios en aminoácidos adyacentes a la región de unión del receptor, aunque la mutación S252W es más frecuente y se relaciona con paladar hendido (12). Por otro lado, la mutación P253R se relaciona con sindactilia más severa en pies (11), también encontrándose este fenotipo en modelos murinos (13). Para el caso de la mutación S252W la frecuencia reportada es el 71% y del 26% para la P253R, estando la primera más relacionada con paladar hendido (12) y la segunda con sindactilia más severa en pies (11). En este trabajo encontramos una frecuencia mutacional muy similar a lo descrito mundialmente: 63,6% de pacientes con la mutación S252W y un 36,4% de pacientes con P253R.

Cuando alguna de las dos mutaciones están presentes, la 755C>G (S252W) o 758 C>G (P253R), los aminoácidos alternativos adyacentes a la región de unión del receptor favorecen el splicing alternativo del gen hacia la isoforma C (originalmente debería amplificarse la isoforma B) (14), modificando su afinidad hacia una mayor promiscuidad por sus FGFs (15-17). Esto lleva a un incremento en la afinidad de unión del receptor a determinados ligandos, de modo que esta vía incrementa su actividad basal, estimulando la activación trancipcial de genes de proliferación (PI3K, ERK) y de diferenciación ósea (p38, ERK, RUNX2) (18,19).

Finalmente, encontramos en más de la mitad de los casos, una edad paterna mayor a 30 años, tal como lo menciona la literatura, donde este hallazgo es frecuente en esta patología (20,21).

Con este primer estudio en pacientes colombianos con SA, se pudo establecer el diagnóstico molecular de forma rápida y efectiva y por otro lado, se logró describir las frecuencias mutacionales para FGFR2, las cuales fueron semejantes a las reportadas mundialmente. Se recomienda emplear herramientas moleculares como las acá descritas para la realización de diagnósticos confirmatorios de manera oportuna que redunden en un manejo clínico adecuando y en un completo asesoramiento genético.

## Conflictode interés

Ninguno declarado por los autores.

## Financiación

Dirección Nacional de Investigaciones (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

## Agradecimientos

A la Dirección Nacional de Investigaciones (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, por la financiación del proyecto y a la Dra. Angela María Castro por su aporte en la consecución algunos de los pacientes.

## Referencias

- Apert ME.** De l'acrocephalosyndactylie. Bull MemSoc Med Hop Paris. 1906;23:1310-30.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). [Internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 1985 [actualizado 7 Jun 2013; citado 4 febrero 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
- Ornitz DM, Marie PJ.** FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. Genes Dev. 2002;16:1446-65.
- Tolarova MM, Harris JA, Ordway DE, Vargervik K.** Birth prevalence, mutation rate, sex ratio, parents' age, and ethnicity in Apert syndrome. Am J Med Genet. 1997;72:394-8.
- Cohen MM Jr, Kreiborg S, Lammer EJ, Cordero JF, Mastrotacovo P, Erickson JD, et al.** Birth prevalence study of the Apert syndrome. Am J Med Genet. 1992;42:655-9.
- Cohen Jr MM, Kreiborg S.** Skeletal abnormalities in the Apert syndrome. Am J Med Genet. 1993;47:624-32.
- Cohen MM Jr, Kreiborg S.** Growth pattern in the Apert syndrome. Am J Med Genet. 1993;47:617-23.
- Murovic JA, Posnick JC, Drake JM, Humphreys RP, Hoffman HJ, Hendricks EB.** Hydrocephalus in Apert syndrome: a retrospective review. Pediatr Neurosurg. 1993; 19:151-5.
- Patton MA, Goodship J, Hayward R, Lansdown R.** Intellectual development in Apert's syndrome: a long term follow up of 29 patients. J Med Genet. 1988;25:164-7.
- Jones, KL.** Smith's Recognizable Pattern of human malformation. 6th ed. La Jolla: Elsevier. 2006:474-77.
- Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, et al.** Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. Nat. Genet. 1995;9:165-72.
- Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Moriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AO, et al.** Differential effects of FGFR2

- mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. Am J Hum Genet. 1996;58:923-32.
- 13. Yin L, Du X, Li C, Xu X, Chen Z, Su N, et al.** A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. Bone. 2008;42:631-43.
- 14. Gorlin RJ.** Fibroblast growth factors, their receptors and receptor disorders. J Craniomaxillofac Surg. 1997;25:69-79.
- 15. Dell KR and Williams LT.** A novel form of fibroblast growth factor receptor 2: Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. J. Biol. Chem. 1992;267:2125-9.
- 16. Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, et al.** Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: Two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992;89:246-50.
- 17. Yayon A, Zimmer Y, Shen GH, Avivi A, Yarden Y, and Givol D.** A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: Implications for the origin of the immunoglobulin fold. EMBO J. 1992;11:1885-90.
- 18. Ibrahimi OA, Chiu ES, McCarthy JG, Mohammadi M.** Understanding the Molecular Basis of Apert Syndrome. Plast. Reconstr. Surg. 2005;115:264-70.
- 19. Wang Y, Xiao R, Yang F, Karim BO, Iacovelli AJ, Cai J, et al.** Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/S252W) mouse. Development. 2005;132:3537-48.
- 20. Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, et al.** Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. Nat Genet. 1996;13:48-53.
- 21. Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW.** The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. Am J Hum Genet. 2003;73:939-47.