

ÉRIKA CRISTINA LOPES B. DE FREITAS

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)
Érika Cristina Lopes Burrone de Freitas.
Campinas, 23 de fevereiro de 2005.

Prof(a). Dr(a). Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Orientador(a) 

ESTUDO DE CRANIOSSINOSTOSES POR MEIO DE INVESTIGAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ESPECÍFICAS

2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÉRIKA CRISTINA LOPES B. DE FREITAS

ESTUDO DE CRANIOSSINOSTOSES POR MEIO DE INVESTIGAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ESPECÍFICAS

Dissertação de Mestrado, apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: *Prof^ª. Dra Vera Lúcia Gil da Silva Lopes*

COORIENTADORA: *Prof^ª. Dra Maricilda Palandi de Mello*

CAMPINAS
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F884e

Freitas, Érika Cristina Lopes Burrone de

Estudo de craniossinostoses por meio de investigação de regiões
genômicas específicas / Érika Cristina Lopes Burrone de Freitas.
Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores : Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, Maricilda Palandi de
Mello

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Crânio – Anomalias e deformidades. 2. Craniossinostose. 3.
Fator de crescimento fibroblástico - receptores. 4. MSX-2 proteína. I.
Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva. II. Mello, Maricilda Palandi de. III.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

(slp/fcm)

UNIDADE BC
CHAMADA F884e
EX
OMBO RC/ 64192
ROC 16-P.00086.05
Bx
PREÇO 11.00
DATA 05/08/05
Nº CPD

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Membros:

1. *Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes*

2. *Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz*

3. *Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato*

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/2005

*Aos meus pais,
A vocês devo tudo que sou hoje. Nos ensinamentos da vida, foram mestres.
Na minha caminhada, ensinaram-me a agir com dignidade, honestidade e respeito.
Como lição, aprendi a ser responsável e humana. Aprendi a lutar e enfrentar
obstáculos. Acreditaram em mim e hoje sou fruto dessa confiança..*

*Aos meus irmãos e os demais membros de minha família, que são a base do
meu caráter e de minha personalidade, da minha vida.*

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes*, não apenas por me transmitir seus conhecimentos, mas também por me transmitir sua experiência e me apoiar nas minhas dificuldades.

À *Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello*, por toda a ajuda técnica e por ter-me acolhido tão bem no CBMEG.

Ao Bruno e aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e compreensão.

À sempre prestativa Madá e à Fer Soardi, que muito me ensinaram e me ajudaram no laboratório do CBMEG.

Aos colegas do CBMEG e do Departamento de Genética Médica, pela amizade, pelo agradável convívio e pelas dicas que me deram durante a realização deste estudo.

À *Profa. Dra. Edi*, *Prof. Dr. Victor Ferraz* e à *Profa. Dra. Denise Cavalcante* que, com suas observações, contribuíram para a forma final desta tese.

A todos os professores que tive e que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos pacientes e familiares que participaram do estudo.

À agência financiadora CAPES e FAEP.

*“Sou entre flor e nuvem,
estrela e mar.*

*Por que havemos de ser unicamente humanos,
Limitados em chorar?*

*Rastro de flor e estrela,
Nuvem e mar.*

*Meu destino é mais longe e meu passo mais rápido;
a sombra é que vai devagar.”*

(Cecília Meireles)

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando,

A certeza de que é preciso continuar

*E a certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar.*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo,

Da queda, um passo de dança,

Do medo, uma escada,

Do sonho, uma ponte,

Da procura, um encontro.”

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Apresentação	29
1.2 Mecanismos de fechamento das suturas e formação das craniossinostoses	29
1.3 Craniossinostoses sindrômicas	31
1.3.1 Síndrome de Apert	31
1.3.2 Síndrome de Pfeiffer	32
1.3.3 Síndrome de Saethre-Chotzen	32
1.3.4 Síndrome Muenke	32
1.3.5 Síndrome Boston	33
1.3.6 Outras síndromes com a presença de craniossinostose	33
1.4 Craniossinostoses isoladas	33
1.5 Introdução aos aspectos moleculares do desenvolvimento normal do crânio e dos membros	34
1.5.1 Gene TWIST	34
1.5.2 Família dos FGFRs	38
1.5.2.1 Gene FGFR1	42
1.5.2.2 Gene FGFR2	44
1.5.2.3 Gene FGFR3	48
1.5.3 Gene MSX2	50
1.6 Mecanismo de Regulação da Formação das Sutures Cranianas	52
1.7 Mecanismo de Regulação da Formação dos Membros	55
1.8 Investigação de craniossinostoses	56

2.	OBJETIVOS	59
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Casuística	65
3.2	Estudo laboratorial	67
4.	RESULTADOS	81
5.	DISCUSSÃO	97
6.	CONCLUSÕES	109
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8.	ANEXOS	
	Anexo 1: Heredogramas dos casos familiares	133
	Anexo 2: Consentimento Livre e Esclarecido	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE TWIST.	37
TABELA 2	MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE FGFR1	44
TABELA 3	MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE FGFR2	46
TABELA 4	MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE FGFR3	50
TABELA 5	MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE MSX2	52
TABELA 6	RESUMO DA CASUÍSTICA E SEUS PRINCIPAIS SINAIS CLÍNICOS.	66
TABELA 7	SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA.	68
TABELA 8	SEQUÊNCIA DE PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE TWIST.	69
TABELA 9	SOLUÇÕES PARA A MINI PREPARAÇÃO.	72
TABELA 10	SEQUÊNCIA DE PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE FGFR1.....	74
TABELA 11	SEQUÊNCIA DE PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE FGFR2.....	75
TABELA 12	SEQUÊNCIA DE PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE FGFR3.....	77
TABELA 13	SEQUÊNCIA DE PRIMERS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE MSX2.....	79
TABELA 14	PRIMERS ALELO-ESPECÍFICOS PARA A MUTAÇÃO Q289P.	88
TABELA 15	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DOS 5 PRINCIPAIS GENES RELACIONADOS ÀS CRANIOSSINOSTOSES.....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	PRINCIPAIS SUTURAS E FONTANELAS DO CRÂNIO HUMANO.	30
FIGURA 2	ESQUEMA REPRESENTATIVO DO GENE TWIST.....	36
FIGURA 3	ESTRUTURA PRIMÁRIA DO FGFR.....	39
FIGURA 4	MODELO DE DIMERIZAÇÃO A E ATIVAÇÃO DO FGFR.....	40
FIGURA 5	PRINCIPAIS MUTAÇÕES NOS FGFRS E QUADROS CLÍNICOS.....	42
FIGURA 6	LOCAIS DE AÇÃO E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DOS OSSOS DA CALVÁRIA.....	53
FIGURA 7	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ASSOCIAÇÕES CONHECIDAS E POUCO CONHECIDAS ENTRE FATORES LIGADOS A CRANIOSSINOSTOSES.....	55
FIGURA 8	ALGORITMO PARA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE CRANIOSSINOSTOSES SINDRÔMICAS.	57
FIGURA 9	CICLOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTOS TW1 E TW2.	70
FIGURA 10	CICLOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO.....	73
FIGURA 11	CICLOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO FGFR1.	74
FIGURA 12	CICLOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 8 E 10 DO FGFR2.....	76
FIGURA 13	CICLAGEM DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO MANUAL.....	76
FIGURA 14	CICLOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 7 DO FGFR3.	78
FIGURA 15	CICLOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTOS MSX2.	80
FIGURA 16	AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 1.	83
FIGURA 17	AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 2.	84
FIGURA 18	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DO TW2: MUTAÇÃO ILE156VAL.....	85
FIGURA 19	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DO TW2: MUTAÇÃO PHE187TYR	85
FIGURA 20	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DO TW2: MUTAÇÃO ASP157ASN.....	85
FIGURA 21	AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO FGFR1.....	86
FIGURA 22	AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO FGFR1 APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>MNL I</i> – BUSCA PELA MUTAÇÃO P252R.....	87
FIGURA 23	AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS IIIA E IIIC DO FGFR2.....	87
FIGURA 24	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO COM O <i>PRIMER SENSE</i> DO EXON IIIA DO FGFR2: MUTAÇÃO GLN289PRO.....	88

FIGURA 25	CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO Q289P POR PCR ALELO-ESPECÍFICO	89
FIGURA 26	AMPLIFICAÇÃO DO EXON IIIA DO FGFR2 APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>Bsa</i> JI – CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO Q289P	90
FIGURA 27	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO DO EXON IIIA DO FGFR2: MUTAÇÃO SER252TRP	91
FIGURA 28	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO DO EXON IIIA DO FGFR2: MUTAÇÃO SER267PRO	91
FIGURA 29	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO DO EXON IIIC DO FGFR2: MUTAÇÃO SER351CYS	92
FIGURA 30	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO DO EXON IIIC DO FGFR2: MUTAÇÃO CYS342TYR	92
FIGURA 31	AMPLIFICAÇÃO DO EXON 7 DO FGFR3	93
FIGURA 32	AMPLIFICAÇÃO DO EXON 7 DO FGFR3 APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>Nci</i> I – BUSCA PELA MUTAÇÃO P250R	94
FIGURA 33	AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO MSX2	94
FIGURA 34	PARTE DO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO DO FRAGMENTO DO MSX2: MUTAÇÃO PRO148HIS E LEU154PRO	95
FIGURA 35	LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO FGFR2	101
FIGURA 36	NOVA PROPOSTA PARA DIAGNÓSTICO DAS CRANIOSSINOSTOSES SINDRÔMICAS	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	<i>Acrocefalossindactilia</i>
AER	<i>Apical Ectodermal Ridge</i>
AP	<i>Alcaline Phosphatase</i>
b-HLH	<i>basic Helix-loop-helix</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BPS	<i>Binding Sialoprotein</i>
CBFA1	<i>Core-Binding Factor, Runt Domain, Alpha Subunit 1</i>
DNA	<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ácido Etilenodiaminotetracético</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
ID	<i>Inhibitor of DNA binding</i>
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor I</i>
MCA	<i>Multiple Congenital Anomalies</i>
MSX	<i>Muscle Segment Homeo Box</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim</i>
ON	<i>Osteonectin</i>
pb	<i>pares de base</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTC	<i>Patched, Drosophila, Homolog of</i>
RNA	<i>Ribose Nucleic Acid</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SDS	<i>Dodecil Sulfato de Sódio</i>
SC	<i>Síndrome de Crouzon</i>
SSC	<i>Síndrome de Saethre-Chotzen</i>
JW	<i>Síndrome de Jackson-Weiss</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>

RESUMO

RESUMO

Craniossinostose pode ser definida como a fusão prematura de uma ou mais suturas dos ossos chatos do crânio, afetando cerca de 0,4-1:1000 nascidos vivos. Mais de 100 síndromes diferentes com a presença de craniossinostose já foram descritas,, sendo a maioria de transmissão autossômica dominante e expressividade variável. O diagnóstico clínico geralmente é dificultado pela sobreposição de sinais clínicos nas diversas síndromes.

A morfogênese do crânio está relacionada a um complexo mecanismo de regulação gênica, do qual fazem parte os genes FGFR1, FGFR2, FGFR3, MSX2 e TWIST. Mutações nesses genes são causas conhecidas de craniossinostoses.

Na intenção de se identificarem mutações nas principais regiões destes genes em indivíduos com craniossinostoses sindrômicas ou isoladas, 13 famílias e 8 casos isolados foram investigados. O protocolo de investigação incluiu avaliação dismorfológica e análise citogenética. A investigação molecular baseou-se num algoritmo previamente descrito e em revisão da literatura. Incluiu a busca pela mutação P252R do gene FGFR1, mutações nos exons 8 e 10 do gene FGFR2, a mutação P250R do gene FGFR3 , e mutações no exon 1 do gene TWIST. A mutação L154P no gene MSX2 também foi investigada em indivíduos com forame parietal.

Em um indivíduo com SSC foi encontrada uma alteração cromossômica envolvendo a região do gene TWIST (46, XX add 7(p21)). No gene FGFR2, mutações no exon 8 foram detectadas em 3/21, sendo que uma delas foi num caso de Apert, outra num caso de Pfeiffer tipo I e no terceiro, uma mutação nunca antes descrita na SSC (FGFR2 Q289P); mutações no exon 10 foram detectadas em 2/21, num caso de Crouzon e outro de Pfeiffer tipo III. Uma família com SSC apresentava a mutação P250R no gene FGFR3 e 3 alterações foram encontradas no exon 1 do gene TWIST, sendo que todos os casos apresentavam SSC. Investigações no gene FGFR1 foram normais, assim como no gene MSX2. Dentre os indivíduos MCA, nenhuma alteração molecular foi encontrada nas regiões estudadas. Esse estudo reforça a heterogeneidade das craniossinostoses e sugere que sejam feitas investigações no gene FGFR2 em casos de SSC. Futuros estudos poderão elucidar a etiologia dos casos de forame parietal e também dos casos MCA.

ABSTRACT

ABSTRACT

Craniosynostosis refers to the premature fusion of one or more of the cranial sutures, affecting about 0,4-1/1000 newborns. More than 100 distinct genetic syndromes with craniosynostosis have been described. Most of them exhibit autosomal dominant transmission and variable expressivity. Clinical diagnostic is also often difficulted by the overlapping features among different conditions. Maintenance of suture patency depends on regulating a complex array of factors, including FGFR1, FGFR2, FGFR3, MSX2 and TWIST. Mutations in these genes are known to cause craniosynostosis, the former by constitutive activation and the latter by haploinsufficiency.

In order to identify mutations in the main regions of these genes in individuals with syndromic or isolated craniosynostosis, 13 families and 8 isolated cases were screened. The investigation protocol included dysmorphological evaluation and high resolution cytogenetics analysis. Molecular investigation was based upon an algorithm previously described and literature review. It included the P252R mutation of FGFR1, mutations in exon 8 and 10 of FGFR2 gene, P250R of FGFR3 gene, and mutations in exon 1 of TWIST gene. The mutation L154P in MSX2 were investigated in individuals with parietal foramina.

One individual with SCS showed a chromosomal aberration involving the region of TWIST gene (46, XX add 7(p21)). In FGFR2, mutations in exon 8 were detected in 4/21, including a previously undescribed one on SSC (FGFR2 Q289P); mutations in exon 10 were detected in 2/21. One family with SCS had a P250R FGFR3 mutation and 3 alterations in exon 1 of the TWIST gene. Investigations in FGFR1 were normal, as well as the MSX2 gene in individuals with parietal foramina. Among MCA individuals, no molecular abnormalities were found in the studied regions. This study reinforces the molecular heterogeneity of craniosynostosis and suggests the screening of FGFR2 gene as complementary step in SCS investigation. In the future, studies could elucidate the etiology of parietal foramina and MCA individuals herein evaluated.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

As craniossinostoses são anomalias craniofaciais que podem acometer o indivíduo desde a vida intra-uterina e podem ser definidas como a fusão prematura de uma ou mais suturas dos ossos chatos do crânio, acarretando conformação craniana anormal. Suas principais consequências são hipertensão intracraniana, diminuição de fluxo sanguíneo cerebral, obstrução de vias aéreas, diminuição da acuidade visual e auditiva, déficit de aprendizado e efeitos psicológicos adversos. Esse sinal clínico tem incidência de 0,4 – 1:1000 nativos (COHEN, 1986).

Tanto fatores genéticos como não genéticos contribuem para causar o desenvolvimento craniofacial anormal (WILKIE, 1997). As craniossinostoses podem ocorrer devido à interferência de fatores ambientais (mecânicos) e genéticos (multifatoriais, isoladas com transmissão entre gerações), ou ainda apresentarem-se como parte de quadros de anomalias congênitas múltiplas (COHEN, 1986).

Atualmente, considera-se que a formação e o desenvolvimento do crânio estão relacionados a um complexo mecanismo de regulação gênica, do qual fazem parte, reconhecidamente, os genes TWIST, os Receptores de Fator de Crescimento de Fibroblasto 1, 2 e 3 e MSX2 (WILKIE, 1997). Neste trabalho, foi investigada a presença de mutações nas principais regiões desses genes, em indivíduos com sinais clínicos sugestivos de craniossinostoses sindrômicas mais comuns como Apert, Pfeiffer, Crouzon e Saethre-Chotzen, também casos de anomalias congênitas múltiplas com alteração de contorno craniano, casos de craniossinostose isolada e casos com forame parietal .

1.2 Mecanismos de fechamento das suturas e formação das craniossinostoses

A morfogênese dos ossos da abóbada craniana e do complexo facial é um longo processo que se inicia precocemente na embriogênese e completa-se durante a idade adulta.

As suturas são membranas de tecido conjuntivo denso que contêm células osteogênicas imaturas com rápida capacidade divisória e formam articulações fibrosas. Uma porção dessas células diferencia-se em osteoblastos e produz novo osso (WILKIE, 1997; OPPERMAN, 2000).

Por volta de 18 semanas, os ossos mineralizados e as suturas são induzidos ao longo das linhas de aproximação. Conseqüentemente, o crânio se alarga devido ao crescimento oposicional das suturas, com deposição de matriz óssea pré-mineralizada (osteóide) ao longo das suturas marginais (WILKIE, 1997; MOORE, 2000).

Normalmente, a fontanela posterior fecha-se aos três meses, e a anterior, aos oito meses de idade extra-uterina. O crânio tem um período de máximo crescimento nos primeiros 12 meses de vida extra-uterina e continua crescendo até os 12 anos de idade. Entretanto, a ossificação completa dá-se em torno dos 50 anos (MOORE, 2000).

Dependendo da posição das suturas em relação aos ossos do crânio, elas podem ser denominadas de frontal ou metópica, sagital, coronária, lambdóide e temporal (Figura 1). Seis grandes áreas fibrosas denominadas fontanelas estão presentes onde várias suturas se unem. Da mesma forma que as suturas, as fontanelas podem ser classificadas de acordo com sua localização em relação aos ossos do crânio em: anterior ou bregmática, ântero-laterais (esfenóides), póstero-laterais (mastóides) e posterior ou lambdóide (Figura 1).

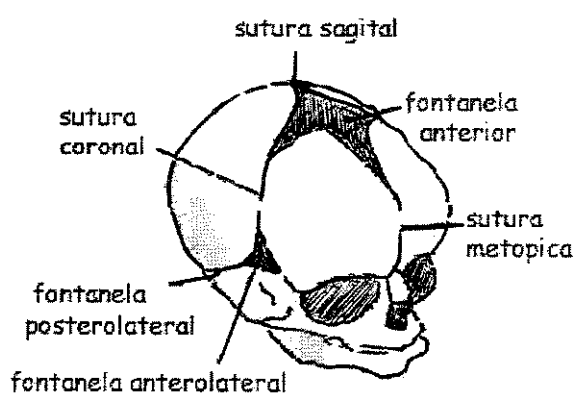


Figura 1 Principais suturas e fontanelas do crânio humano.

O crânio pode assumir algumas formas características dependendo da sutura específica envolvida na desordem de progressão da ossificação.

1.3 Craniossinostoses sindrômicas

As condições clínicas com presença de craniossinostose têm diferentes fenótipos que, muitas vezes, sobrepõem-se e ocorrem por formação anômala de condrocrânio (ossificação endocondral irregular) ou do neurocrânio (ossificação intra-membranosa). Quando são acompanhadas por anomalias de membros, sugerem que aspectos do desenvolvimento craniofacial e de membros utilizam caminhos moleculares comuns (WILKIE,1997).

Algumas semelhanças clínicas como craniossinostose, hipertelorismo ocular, proeminência ocular, nariz em bico, hipodesenvolvimento de face média e anomalias variáveis de mãos e pés são encontradas nessas síndromes, em geral de transmissão autossômica dominante (GRIPP et al.,1999).

Dentre os quadros de craniossinostoses associadas a anomalias de membros, destacam-se as Acrocefalossindactilias (ACS). Incluem-se neste grupo, a Síndrome de Apert (ACS Tipo I, OMIM 101200), Síndrome de Saethre-Chotzen (ACS Tipo III, OMIM 101400) e Síndrome de Pfeiffer (ACS Tipo V, OMIM 101600).

Mais de 100 síndromes diferentes, com a presença de craniossinostose, já foram descritas. Muitas vezes o diagnóstico clínico é difícil, pois muitos sinais clínicos sobrepõem-se nas diferentes síndromes.

A maioria delas apresenta transmissão autossômica dominante e expressividade variável, com portadores muitas vezes possuindo sinais muito brandos.

1.3.1 Síndrome de Apert (ACS I, OMIM 101200)

A Síndrome de Apert é uma heredopatia autossômica dominante. Sua incidência é de 1:100.000 nascidos vivos. Seus principais sinais clínicos são craniossinostose, sindactilia de tecidos moles e ósseos dos dedos e artelhos, envolvendo número variável de dedos. Podem possuir também atraso do desenvolvimento motor, deficiência mental, turribraquicefalia, hipoplasia de linha média da face de moderada a severa, fusão das vértebras cervicais, ocasionalmente hidrocefalia e anomalias de órgãos internos

(COHEN e KREIBORG, 1993). Existem duas mutações altamente recorrentes que levam a essa síndrome: a mutação P252W e a P253R no gene FGFR2.

1.3.2 Síndrome de Pfeiffer (ACS V, OMIM 101600)

A Síndrome de Pfeiffer é uma heredopatia autossômica dominante, com incidência de 1:100.000 nascidos vivos, muito heterogênea tanto nos aspectos clínicos quanto moleculares, por isso foi dividida em três tipos: tipo I, II e III, sendo que a primeira tem um prognóstico mais favorável que as outras duas. Suas principais características fenotípicas são craniossinostose, polegares e háluces alargados e sindactilia variável. As alterações moleculares causadoras desta síndrome estão relacionadas à mutação P252R no gene FGFR1 (5% dos casos) e mutações no gene FGFR2 (95% dos casos).

1.3.3 Síndrome de Saethre-Chotzen (ACS III; OMIM 101400)

A Síndrome de Saethre-Chotzen é uma heredopatia autossômica dominante, com incidência de 1:25.000 –1:50.000 nascidos vivos (PAZNEKAS et al., 1998). Possui uma alta penetrância e expressividade variável, o que pode dificultar o diagnóstico de formas mais brandas. Seus principais sinais clínicos são craniossinostose, implantação baixa dos cabelos na fronte, orelhas dismórficas, assimetria facial, blefaroptose, braquidactilia e sindactilia cutânea, preferencialmente entre 2º. e 3º. dedos. As alterações moleculares associadas a esta entidade clínica estão relacionadas ao gene TWIST. Alguns estudos com pacientes portadores de SSC, sem mutação no TWIST, encontraram alterações nos genes FGFR2 e FGFR3 (REARDON et al,1997; PAZNEKAS et al,1998).

1.3.4 Síndrome Muenke (OMIM 602849)

A Síndrome Muenke, como a maioria das craniossinostoses sindrômicas, é uma heredopatia autossômica dominante e também possui expressividade variável. Este

fenótipo caracterizado principalmente pela presença de craniossinostose da sutura coronal, é causado por uma única mutação específica no FGFR3; trata-se da troca de uma prolina por uma arginina no aminoácido 250 (mutação P250R) (MUENKE et al., 1997).

1.3.5 Síndrome Boston (OMIM 604757)

A Síndrome Boston possui transmissão autossômica dominante, com dominância completa e expressividade variável. Decorre da uma única mutação no gene MSX2 (JABS et al., 1993). Trata-se da troca de uma prolina por uma histidina na posição 148 (mutação P148H). Esta mutação encontra-se na parte conservada do homeodomínio deste gene.

1.3.6 Outras síndromes com a presença de craniossinostose

Jackson-Weiss (OMIM 123150) e Crouzon (OMIM 123500) são síndromes decorrentes de mutações no gene FGFR2, sendo que no quadro clínico de JW há alteração de membros, e em Crouzon não há.

A Síndrome de Crouzon tem como principais sinais: craniossinostose, hipoplasia maxilar e proptose ocular.

1.4 Craniossinostoses isoladas

A grande maioria das craniossinostoses são isoladas, ocorrendo em pacientes com nenhuma outra anormalidade (COHEN, 1986). Raramente são encontradas craniossinostoses isoladas familiares. Nesses casos, também o padrão de herança é autossômico dominante, com penetrância reduzida e o risco de recorrência depende de qual das suturas está envolvida (LAJEUNIE et al., 1995; LAJEUNIE, 1996; COHEN, 1986).

Em muitos casos a causa da craniossinostose é secundária, ou seja, pode ser resultada de desordens hematológicas ou metabólicas ou de danos do meio como infecções intra-uterinas, drogas ou traumas (MULLER et al., 1997).

1.5 Introdução aos aspectos moleculares do desenvolvimento normal do crânio e dos membros

A formação e o desenvolvimento do crânio estão relacionados a um complexo mecanismo de regulação gênica. Do ponto de vista molecular, os principais genes envolvidos nessa regulação e que estão relacionados às craniossinostoses síndrômicas são: TWIST, FGFR1, FGFR2, FGFR3 e MSX2, embora outros genes já tenham sido descritos.

Com relação às craniossinostoses não síndrômicas, existem poucos relatos de mutações.

1.5.1 Gene TWIST

THISSE e colaboradores, em 1988, identificaram um gene denominado TWIST em estudos com *Drosophila melanogaster* e propuseram que ele estaria envolvido precocemente na formação do mesoderma. Em estudos realizados nesse modelo, SHISHIDO et al. (1993) indicaram que a proteína TWIST afetaria a transcrição dos FGFRs. BOUGEOIS et al. (1996) notaram que esse gene codifica uma proteína contendo um domínio básico hélice-alça-hélice (b-HLH), partilhada por muitas proteínas de ligação ao DNA e, muito provavelmente, funcionaria como fator de transcrição. Estes autores observaram que embriões murinos homozigotos *Twist-null* exibiam falha no fechamento do tubo neural, enquanto os heterozigotos resultavam em fenótipos mais brandos consistentes com aqueles encontrados na Síndrome de Saethre-Chotzen.

Em humanos, o primeiro locus para SSC foi sugerido por meio de estudo de polimorfismos de fragmento de restrição (BRUETON et al., 1992), seguido de polimorfismo com microsatélites (VAN HERWERDEN et al., 1994). A detecção de translocações cromossômicas envolvendo a região 7p21 e 7p22 (REID et al., 1993), em

famílias portadoras dessa entidade, pôde dirigir os estudos para o uso de citogenética com hibridização fluorescente *in situ* (FISH). BOUGEOIS et al. (1996) e HOWARD et al. (1997) mapearam o gene TWIST humano na região 7p21-p22 por análise de ligação.

Estudos moleculares em pacientes com SSC demonstraram mutações no gene TWIST, nos domínios hélice I, alça (*loop*) e básico de ligação ao DNA, resultando em substituições de aminoácidos ou terminação prematura da proteína (HOWARD et al., 1997 e EL GHOUZZI et al., 1997).

KREBS et al. (1997) descobriram que o ponto de quebra de uma translocação aparentemente balanceada t(6;7)(q16.2;p15.3), associada a uma forma branda de SSC (TSUJI et al., 1995), ocorreu aproximadamente a 5kb na região 3' do locus do TWIST, acarretando a perda de 518bp do cromossomo 7. Sequências potencialmente exônicas, flanqueando o cromossomo 7 no ponto de translocação, não correspondiam a genes conhecidos nos bancos de dados pesquisados. Eles estabeleceram que o rearranjo à jusante do TWIST implicou perda de função de um alelo por efeito posicional causando a síndrome, o que seria compatível com a hipótese do TWIST ser o gene da SSC.

ROSE et al. (1997) relataram que os pontos de quebra em 4 pacientes com SSC não interrompiam a sequência codificante do gene TWIST e assim, mais provavelmente, estaria agindo através de um efeito posicional. Mutações no gene TWIST foram encontradas em 12 casos de SSC. Quatro dessas famílias estavam presentes em estudos de ligação para o locus da SSC. Foram detectadas mutações *missense* e *nonsense* e 3 casos de duplicação de 21pb; três famílias, entretanto, foram identificadas como portadoras de uma mutação P250R no gene FGFR3 (GOLLA et al., 1997). Além de translocações balanceadas (WILKIE et al., 1995; KREBS et al., 1997), outros estudos detectaram, no gene TWIST, microdeleções e ausência de translocações nas regiões codificadoras (ZACKAI et al., 1998; JOHNSON et al., 1998).

O gene TWIST contém 2 exons de 772bp e 645bp, separados por um único intron de 538bp.

O exon 1 é traduzido formando uma proteína com estrutura básica b-HLH. O exon 2 não é traduzido (HOWARD et al., 1997; ROBIN, 1999). A figura 2 mostra o esquema representativo do gene TWIST (YOUSFI et al, 2001).

Na figura 2 temos o esquema com a representação do gene TWIST.

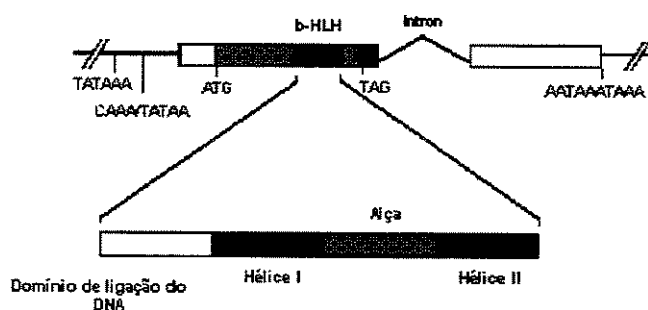


Figura 2 Esquema representativo do gene TWIST.

As mutações do TWIST envolvem perda de função (haploinsuficiência), diferente das mutações nos genes MSX2 e FGFR que envolvem ganho de função. Essa hipótese é suportada pela evidência de mutações nonsense frequentes no gene TWIST, o que não ocorre nos genes MSX2 e FGFR. EL GHOUZZI et al. (1999) encontraram mutações no TWIST em 16 de 22 pacientes com SSC não aparentados. Todas essas mutações envolviam o domínio b-HLH da proteína. Os genótipos mutantes incluíram deleções, inserções e mutações nonsense e missense, truncando ou causando ruptura do motivo b-HLH da proteína. Em dois dos 22 casos estudados, havia a mutação P250R no gene FGFR3, apresentando manifestações clínicas brandas da SSC.

A hipótese da SSC também ser causada pela haploinsuficiência resultante de deleções em um alelo sugere que o gene TWIST, tendo reduzido sua expressão, levaria ao aumento do crescimento celular e síntese de colágeno, bem como da capacidade osteogênica. Contudo, inibiria a expressão do gene da osteocalcina. Isso prevê um mecanismo que pode contribuir para a ossificação cranial prematura induzida por deleção do domínio b-HLH do TWIST na SSC (YOUSFI et al., 2001).

Estudos moleculares demonstraram que mutações nonsense no gene resultam em proteínas truncadas e instáveis, mais rapidamente degradadas, levando à haploinsuficiência.

Na Tabela 1, estão as mutações encontradas no exon 1 do gene TWIST até o momento.

Tabela 1 Mutações encontradas no gene TWIST**SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (MISSENSE/NONSENSE)**

Códon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referência
28	gCAG- TAG	Gln-Term	SSC	Gripp (2000)
61	cGGA-TGA	Gly-Term	SSC	Rose (1997)
65	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	Rose (1997)
78	gTCT-CCT	Ser-Pro	SSC	Rose (1997)
103	TACg-TAA	Tyr-Term	SSC	El Ghouzzi (1997)
103	TACg-TAG	Tyr-Term	SSC	Paznekas (1998)
104	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	Paznekas (1998)
116	gCGG-TGG	Arg-Trp	SSC	Paznekas (1998)
118	CGC-CAC	Arg-His	SSC	Rose (1997)
119	CAG-CCG	Gln-Pro	SSC	Howard (1997)
120	CGC-CCC	Arg-Pro	SSC	Gripp (2000)
122	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Paznekas (1998)
123	TCG-TAG	Ser-Term	SSC	El Ghouzzi (1997)
123	TCG-TGG	Ser-Trp	SSC	Johnson (1998)
126	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	El Ghouzzi (1997)
127	GCG-GTG	Ala-Val	SSC	Gripp (2000) Hum
131	CTG-CCG	Leu-Pro	SSC	El Ghouzzi (1997)
132	CGG-CCG	Arg-Pro	SSC	Paznekas (1998)
134	ATCa-ATG	Ile-Met	SSC	Rose (1997)
136	CCC-CTC	Pro-Leu	SSC	Johnson (1998)
139	gCCC-TCC	Pro-Ser	SSC	Paznekas (1998)
141	GAC-GGC	Asp-Gly	SSC	Rose (1997)
141	gGAC-TAC	Asp-Tyr	SSC	Paznekas (1998)
144	gAGC-CGC	Ser-Arg	SSC	El Ghouzzi (1999)
145	AAGa-AAC	Lys-Asn	SSC	Rose (1997)
145	cAAG-GAG	Lys-Glu	SSC	Paznekas (1998)
148	gACC-GCC	Thr-Ala	SSC	Gripp (2000)
148	ACC-AAC	Thr-Asn	SSC	Paznekas (1998)
149	cCTC-TTC	Leu-Phe	SSC	Paznekas (1998)
152	GCG-GTG	Ala-Val	SSC	Paznekas (1998)
154	cAGG-GGG	Arg-Gly	SSC	Rose (1997)
159	cCTC-TTC	Leu-Phe	SSC	Paznekas (1998)
160	TACc-TAG	Tyr-Term	SSC	Gripp (2000)
161	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Paznekas (1998)
164	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Gripp (2000)
181	cGAG-TAG	Glu-Term	S.Baller-Gerold	Gripp (1999)

INSERÇÕES PEQUENAS

91	272	CGGCGGCGGC	SSC	Gripp (2000)
103	308	A	SSC	Howard (1997)
128	384	C	SSC	Paznekas (1998)
154	460	A	S.Robinow-Sorauf	Kunz (1999)

DELEÇÕES PEQUENAS

Códon	Deleção	Fenótipo	Referência
87	CGGCGGC^GCGgGCGGCGGCGG	SSC	Gripp (2000)
117	GTGCGG^GAGCgccagcgcACCCAGTCGC	SSC	El Ghouzzi (1999)
117	CGTGCGG^GAGcgcCAGCGCACCC	SSC	Paznekas (1998)
154	CGGCC^AGGTAcacgcACTTCCTCTA	SSC	El Ghouzzi (1999)
162	CTACCAG^GTCcTCCAGAGCGA	SSC	El Ghouzzi (1999)

DELEÇÕES GRANDES

Descrição	Fenótipo	Referência
23 bp nt. 433 cd. 145	SSC	Howard (1997)
gene inteiro	SSC	Johnson (1998)

INSERÇÕES E DUPLICAÇÕES GRANDES

Descrição	Fenótipo	Referência
Inserção de 21 bp nt 276	SSC	Gripp (2000)
Duplicação de 21 bp nt. 405	SSC	Howard (1997)
Duplicação de 21 bp nt. 416	SSC	Howard (1997)
Duplicação de 21 bp nt. 418	SSC	Rose (1997)
Duplicação de 21 bp nt. 419	SSC	Rose (1997)
Duplicação de 21 bp nt. 421	SSC	Rose (1997)
Inserção de 25 bp nt 423	SSC	El Ghouzzi (1999)

REARRANJOS COMPLEXOS

Descrição	Fenótipo	Referência
Del 2924 bp, ins GT nt 10962	SSC	Johnson (1998)
Del A nt 230, T-C nt 232	SSC	Rose (1997)
Translocação t(2;7)(p23;p22)	SSC	Lewanda (1994)
Translocação t(6;7) (q16.2;p15.3)	SSC	Krebs (1997)
Translocação t(7;8)(p21;q13)	SSC	Johnson (1998)

1.5.2 Família dos FGFRs

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) compreendem uma família de 22 proteínas distintas (revistos por ORNITZ e ITOH, 2001) com funções de sinalização

pleitrópicas no desenvolvimento e homeostase. Essas funções são mediadas principalmente por receptores (FGFRs).

Os FGFRs formam uma família com quatro receptores tirosina-quinase (FGFR 1 a 4), codificados por quatro genes distintos (NASIKI e ORNITZ, 1998). As proteínas codificadas por esses genes possuem uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre seus membros e através da evolução. Os membros da família dos FGFRs diferem uns dos outros em suas afinidades de ligação e distribuição nos tecidos.

Essas proteínas consistem num domínio extramembranoso, que se acopla ao ligante, um domínio transmembranoso e um domínio intracelular tirosina-quinase. A região extracelular contém três domínios imunoglobulina (*Ig-like*), um domínio de acoplamento à heparina e uma sequência de sete aminoácidos ácidos. As regiões implicadas no acoplamento ao ligante são o domínio *Ig-like* II, a região *interloop* entre os domínios II e III e a porção N-terminal da *Ig-like* III.

A sequência C-terminal da *Ig-like* III parece ser importante para a especificidade ao seu ligante, uma proteoglicana denominada sulfato heparan ou heparina. Não há interação direta da sequência C-terminal da *Ig-like* III com a molécula de FGF (MUENKE e SCHELL, 1995; NASIKI e ORNITZ, 1998). A figura 3 mostra a estrutura primária do FGFR ((NASIKI e ORNITZ, 1998).

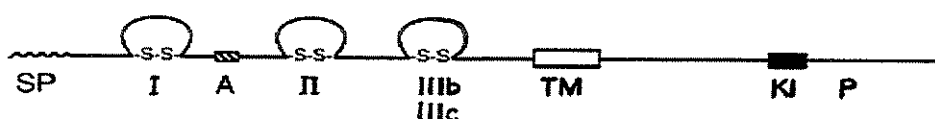


Figura 3 SP, peptídeo sinalizador; A, região ácida; I, II, III, domínios *Ig-like*; TM, domínio transmembranoso; KI, domínio tirosina-quinase; P, região putativa de alta fosforilação; s-s, ponte de sulfeto.

Esses domínios de ligação apresentam variantes por splicing alternativo, de particular interesse por possuírem diferentes especificidades de ligação, além de expressão temporo-espacial única, sugerindo funções específicas em cada fase da

maturação.

Cada receptor mostra alta afinidade com um subtipo de FGF. Até o momento foram identificadas nove proteínas estruturalmente relacionadas à família de Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGF) de mamíferos, denominadas FGF1 a FGF9 (MUENKE e SCHELL, 1995).

A FGF liga-se a glicosaminoglicanas e à heparina (figura 4), que estão localizadas na superfície celular e no interior da matriz extracelular dos FGFRs, servindo como sítios de ligação para as FGF. A heparina liga-se diretamente ao FGFs e FGFRs, modulando a ativação do FGFR (SPIVAK-KROIZMAN et al, 1994; NASKI et al, 1998).

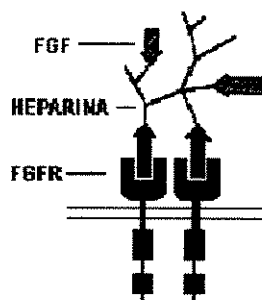


Figura 4 Modelo de dimerização induzida pela heparina e ativação do FGFR.

A ligação de duas FGF aos seus receptores causa sua dimerização, e ativação de seus sítios tirosina-quinase intracelulares. A fosforilação desses receptores inicia ao menos dois tipos de sinais. O primeiro, através da proteína G-Ras, com sinalização para síntese de novo mRNA, o segundo sinal é mediado pela fosfolipase C, que modifica a condição iônica do citoplasma (PARK et al., 1995). As consequências celulares da ativação dos FGFRs são diversas e podem afetar a divisão, diferenciação e também a morte celular, de acordo com o contexto. Da perspectiva da morfogênese, os efeitos sobre a migração celular e interação entre epitélio e mesênquima são particularmente importantes (WILKIE, 2002).

Em resumo, essas proteínas regulam a proliferação, diferenciação, migração celular, angiogênese, cicatrização, desenvolvimento embrionário e estão implicadas na transformação maligna de alguns tecidos.

As mutações nos FGFRs, em particular, apresentam uma das mais destacadas séries, em genética humana, de correlações entre genótipo-fenótipo e mutações alélicas e não alélicas (WILKIE, 1997). Mutações nos genes FGFR1, FGFR2 e FGFR3 têm sido associadas a uma variedade de fenótipos diferentes com a presença de craniossinostose e outras deformidades ósseas. Até hoje não existe nenhuma evidência ligando o FGFR4 a malformações craniofaciais ou esqueléticas (GAUDENZ et al., 1998).

A maioria das mutações nesses genes são missense, com um pequeno número de mutações envolvendo mecanismos de splicing ou pequenas inserções ou deleções, todas elas com sentido. Nenhuma mutação nonsense ou de mudança na matriz de leitura. Isso contrasta com o gene TWIST, anteriormente descrito, no qual as mutações são na maioria nonsense, ou duplicações, com raríssimas mutações missense (WILKIE, 1997).

Muitas mutações nesses genes são altamente recorrentes. Mutações idênticas, nos três FGFRs, são observadas em várias regiões das moléculas. Um exemplo é a troca de uma prolina por uma arginina na região de ligação IgII-IgIII que, quando presente no gene FGFR1, causa a Síndrome Pfeiffer; no FGFR2, a Síndrome Apert; e no FGFR3, a Síndrome Muenke.

Diferentes substituições no mesmo aminoácido também podem levar a diferentes fenótipos; ou a mesma mutação também pode levar a quadros clínicos diferentes.

Fica claro que os genes FGFRs são bons exemplos de heterogeneidade de locus, heterogeneidade alélica e também heterogeneidade clínica.

Todas as mutações descritas nesses genes até hoje são dominantes. Elas sempre geram ganho de função, o que aumenta a afinidade dos receptores pelos seus ligantes, por isso são chamadas mutações de ativação constitutiva, diferente do gene TWIST, no qual as mutações geram perda de função ou haploinsuficiência.

Na figura 5, estão as principais mutações descritas nos três genes e suas localizações, relacionando-as com os quadros clínicos.

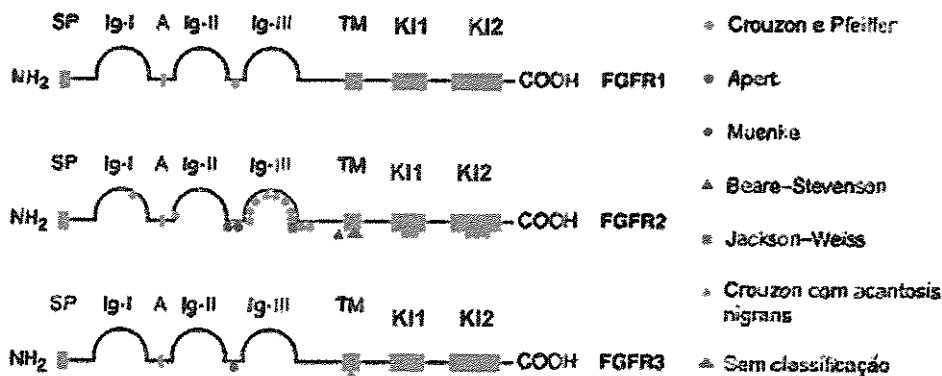


Figura 5 Cada receptor com suas principais mutações e quadros clínicos.

1.5.2.1 Gene FGFR1 (OMIM 136350)

Em 1988, RUTA e colaboradores localizaram o gene FGFR1 na posição 8p12-p11.2, através de hibridização *in situ*. Eles isolaram um gene que codificaria uma proteína tirosino-quinase, mas, primeiramente, chamaram-na de FLG. Segundo LEE et al. (1989), a FLG humana seria equivalente a um receptor básico de galinhas. No mesmo estudo, Lee et al. isolaram o cDNA desse gene e purificaram sua proteína. O receptor FGFB, codificado por este cDNA, seria uma proteína transmembrana que continha três domínios extracelulares *Ig-like*, uma região ácida e um domínio intracelular tirosino-quinase.

Entretanto foram ROBIN et al. (1994) que observaram as primeiras ligações entre pacientes com Pfeiffer e uma região do cromossomo 8. MUENKE et al. (1994) encontraram uma troca C→G no exon 5 do FGFR1, causando a troca de uma prolina por uma arginina no domínio extracelular da proteína, em todos membros afetados de diferentes famílias com a Síndrome Pfeiffer. O resíduo de prolina é altamente conservado através da evolução, estando presente em galinha, ratos, humanos e também nos quatro diferentes FGFRs.

Utilizando modelos animais, ZHOU et al. (2000) demonstraram que ratos que carregavam a mesma mutação P252R de humanos, exibiam um achatamento antero-posterior e um alargamento lateral do crânio. As suturas dos ratos apresentavam

fechamento prematuro, proliferação acelerada dos osteoblastos e aumento na expressão dos genes relacionados à diferenciação de osteoblastos, sugerindo que a formação óssea nas suturas estaria localmente aumentada na Síndrome Pfeiffer.

Até hoje, somente mutação P252R foi descrita em casos com craniossinostose (Tabela 2). Nenhum estudo foi feito sobre o modo de ação dessa mutação, mas foram feitos estudos de mutações análogas nos genes FGFR2 e FGFR3. As mutações similares mostram-se dominantes, por isso os efeitos da proteína alterada são vistos mesmo na presença de um segundo alelo normal. Esses receptores mutantes trabalham melhor que o tipo selvagem. A mutação ocorre na região de ligação entre o segundo e terceiro domínios imunoglobulina, um sítio que se sabe ser importante para a união dos receptores aos seus ligantes. O aumento da afinidade dos receptores aos seus ligantes causa uma excessiva sinalização e regulação (WILKIE, 1997).

A organização genômica do gene FGFR1 é muito similar à dos outros membros da família, contendo 19 exons que estão sujeitos a um complexo splicing alternativo, o qual permite variações estruturais, diferentes expressões nos tecidos e diferentes afinidades de ligação entre as isoformas. Contém 41 introns confirmados, 40 deles alternativos. Possui 20 diferentes transcritos, totalizando 20 diferentes isoformas da proteína. O gene cobre 58.43kb do genoma humano.

O gene FGFR1 é encontrado durante a embriogênese na cartilagem e nos precursores ósseos que formam o esqueleto craniofacial e apical (MUENKE e SCHELL, 1995). No esqueleto apical, ele é expresso durante todo desenvolvimento germinativo dos membros.

As diferentes variantes por splice alternativo (Fgfr1b, Fgfr1c) possuem distribuição temporo-espacial única. O Fgfr1b tem expressão geralmente fraca, quando comparado a outros FGFRs e os transcritos não são vistos nem nos ossos da calvária, nem nas suturas. Fgfr1c foi detectado nos ossos da calvária, mais notavelmente nas frentes osteogênicas, sítios de grande condensação e diferenciação de osteoblastos. É também expresso em muitas cartilagens da cabeça em desenvolvimento (RICE et al., 2000).

Na tabela 2, as mutações encontradas no FGFR1 relacionadas a anomalias craniofaciais.

Tabela 2 Mutações encontradas no gene FGFR1

SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (MISSENSE/NONSENSE)				
Códon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referência
252	CCT-CGT	Pro-Arg	Pfeiffer	Muenke (1994)
300	ATT-ACT	Ile-Thr	Trigonocefalia não-sindrômica	Kress (2000)

1.5.2.2 Gene FGFR2 (OMIM 176943)

A partir de uma biblioteca de cDNA de células tumorais, HOUSSAINT e colaboradores (1990) isolaram um gene que codificava um receptor tirosino-quinase, o qual denominaram TK14. A sequência de aminoácidos era estritamente relacionada à proteína bek (bacterially expressed kinase), e também um pouco parecida com um receptor de fator de crescimento de galinha (73% de homologia), presumindo assim a equivalente humana, a proteína FLG. DIONNE et al. (1990) clonaram um completo cDNA do homólogo humano da proteína bek (simbolizado FGFR2).

Posteriormente MATTEI et al. (1991), utilizando estudos com a técnica de hibridização *in situ*, construíram uma sonda de cDNA de 2.3kb, feita com o receptor de fator de crescimento BEK humano, para determinar a exata localização do gene no braço longo do cromossomo 10 (**10q26**).

Em 1994, REARDON et al, utilizando a técnica de SSCP em indivíduos portadores de Síndrome de Crouzon, ligaram a doença ao gene FGFR2, encontrando mutações nesse gene.

Em estudos com pacientes portadores da Síndrome de Crouzon e também em pacientes com a Síndrome de Jackson-Weiss, JABS et al. (1994) encontraram mutações no gene FGFR2.

Descobriu-se que a Síndrome de Apert também seria causada por mutações no gene FGFR2 (WILKIE et al., 1995), assim como a Síndrome Pfeiffer (LAJEUNIE et al., 1995; RUTLAND et al., 1995).

Em estudos com 39 pacientes com as síndromes de Crouzon, JW e Pfeiffer, MEYERS et al. (1996) observaram que, nessas três condições, as mutações estavam

localizadas no exon IIIc. Somente um caso com a Síndrome de Crouzon possuía uma mutação no exon IIIa.

Em 1999, PASSOS-BUENO et al. publicaram um estudo com uma listagem de todas as mutações encontradas nos três FGFRs, associando-os com diversas entidades clínicas, incluindo acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica, Síndrome Antley-Bixler, Apert, Beare-Stevenson, Crouzon, Jackson-Weiss, Pfeiffer e também Saethre-Chotzen.

A grande maioria das mutações que causam malformações com a presença de craniossinostose ocorrem no domínio extracelular Ig-like III e em regiões adjacentes (exons IIIa e IIIc) do gene FGFR2. Para estudar a aparente concentração das mutações nesta região, KAN et al. (2002) fizeram um grande estudo com 259 pacientes com craniossinostose nos quais mutações em outros genes como FGFR1, FGFR3 e TWIST, já tinham sido excluídas. Nesse trabalho observaram que a maioria das mutações encontravam-se nos exons IIIa e IIIc e também identificaram mutações em sete exons adicionais, incluindo seis mutações distintas na região tirosino-quinase e uma única mutação no domínio IgII. KAN et al. (2002) concluíram que o espectro de mutação no FGFR2 é mais amplo do que se imaginava, mas que na região IgIIIa/IIIc encontra-se a maioria das mutações.

Em uma extensa revisão da genética do desenvolvimento craniofacial e das malformações, WILKIE e MORRIS-KEY (2001) elaboraram um útil diagrama das vias moleculares de desenvolvimento craniofacial, com uma listagem de todas as desordens causadas e as mutações em genes correspondentes. Esses autores indicaram quatro proteínas com forte evidência de serem encontradas nessas vias, com seus sucessivos alvos: TWIST, FGFR2, FGFR1 e CBFA1.

O gene FGFR2 é o maior dos três receptores (120.82kb), possuindo aproximadamente 20 exons. Entretanto INGERSOLL et al. (2001) encontraram uma variante desse gene com 22 exons, possuindo 43 introns confirmados, sendo que 38 deles são alternativos.

Os RNAs mensageiros do gene FGFR2 são encontrados durante a embriogênese, como o FGFR1. Também são encontrados na cartilagem e em

precursores ósseos (MUENKE e SCHELL, 1995). Diferentemente do FGFR1, o gene FGFR2 é primariamente expresso na camada ectodérmica externa.

Até o momento foram descritos mais de 27 transcritos diferentes, ou seja, 27 isoformas da proteína.

A variante Fgfr2b é expressa nas frentes osteogênicas dos ossos parietais, no epitélio em desenvolvimento e na pele, incluindo os folículos capilares. Fgfr2c foi encontrado em regiões similares ao Fgfr2b, mas geralmente com intensidade mais forte. Os transcritos foram detectados no pericondrio e periósteo, nas mesmas localizações, mas com diferentes intensidades. No epitélio em desenvolvimento, os transcritos foram detectados em baixa intensidade, em comparação com Fgfr2b (RICE et al., 2000).

Como descrito para a família dos FGFRs, as mutações no FGFR2 são missense e geram ganho de função. Existem algumas altamente recorrentes como S252W ou Ser252Trp. Deve-se salientar novamente que a grande maioria das mutações até hoje descritas encontram-se na região IgIIIa/IIIc, portanto em todos os estudos utilizando o gene FGFR2, inicia-se a busca de mutações nestes dois exons (exon 8 e exon 10 no FGFR2).

O FGFR2 é o receptor que está ligado ao maior número de entidades clínicas diferentes, incluindo Apert (WILKIE et al., 1995), Crouzon (REARDON et al., 1994), Pfeiffer (RUTLAND et al., 1995; LAJEUNIE et al., 1995; SCHELL et al., 1995), Jackson-Weiss (JABS et al., 1994), Beare-Stevenson (PRZYLEPA et al., 1996), Saethre-Chotzen (PASSOS-BUENO et al., 1999), entre outros.

Na Tabela 3, estão as mutações encontradas no gene FGFR2 até o momento.

Tabela 3 Mutações encontradas no gene FGFR2

SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (MISSENSE/NONSENSE)				
Códon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referência
105	TAT-TGT	Tyr-Cys	Craniossinostose	Pulley (1996)
252	TCG-TTG	Ser-Leu	Crouzon	Oldridge (1997)
252	TCG-TGG	Ser-Trp	Apert	Wilkie (1995)
253	CCT-CGT	Pro-Arg	Apert	Wilkie (1995)
263	CCG-CTG	Pro-Leu	Crouzon	Kress (2000)
267	cTCC-CCC	Ser-Pro	Crouzon	Oldridge (1995)

276	gTTT-GTT	Phe-Val	Crouzon	Steinberger (1998)
278	TGC-TTC	Cys-Phe	Crouzon	Oldridge (1995)
278	TGC-TAC	Cys-Tyr	Crouzon	Kress (2000)
281	TAC-TGC	Tyr-Cys	Crouzon	Tsai (2001)
288	ATC-AGC	Ile-Ser	Crouzon	Kress (2000)
289	CAG-CCG	Gln-Pro	Crouzon	Oldridge (1995)
290	gTGG-CGG	Trp-Arg	Crouzon	Oldridge (1995)
290	TGGa-TGC	Trp-Cys	Pfeiffer	Tartaglia (1997)
290	TGGa-TGT	Trp-Cys	Craniossinostose	Wilkie (1997)
290	gTGG-GGG	Trp-Gly	Crouzon	Park (1995)
292	cAAG-GAG	Lys-Glu	Crouzon	Steinberger (1997)
301	TAC-TGC	Tyr-Cys	Crouzon	Steinberger (1998)
314	gGCC-TCC	Ala-Ser	Craniossinostose	Steinberger (1998)
315	cGCC-TCC	Ala-Ser	Craniossinostose	Johnson (2000)
321	GAC-GCC	Asp-Ala	Pfeiffer	Lajeunie (1995)
328	TAT-TGT	Tyr-Cys	Crouzon	Jabs (1994)
331	AAT-ATT	Asn-Ile	Crouzon	Steinberger (1996)
337	cGCT-CCT	Ala-Pro	Crouzon	Passos-Bueno (1998)
338	tGGG-CGG	Gly-Arg	Crouzon	Gory (1995)
338	GGG-GAG	Gly-Glu	Craniossinostose	Pulleyn (1996)
340	TAT-TGT	Tyr-Cys	Pfeiffer	Cornejo (1999)
340	aTAT-CAT	Tyr-His	Crouzon	Reardon (1994)
341	tACG-CCG	Thr-Pro	Pfeiffer	Rutland (1995)
342	gTGC-CGC	Cys-Arg	Crouzon	Reardon (1994)
342	gTGC-GGC	Cys-Gly	Pfeiffer	Cornejo (1999)
342	TGC-TTC	Cys-Phe	Jackson-Weiss	Meyers (1996)
342	gTGC-AGC	Cys-Ser	Crouzon	Reardon (1994)
342	TGC-TCC	Cys-Ser	Jackson-Weiss	Meyers (1996)
342	TGCT-TGG	Cys-Trp	Crouzon	Park (1995)
342	TGC-TAC	Cys-Tyr	Crouzon	Reardon (1994)
344	GCG-GGG	Ala-Gly	Jackson-Weiss	Jabs (1994)
344	gGCG-CCG	Ala-Pro	Jackson-Weiss	Meyers (1996)
347	TCT-TGT	Ser-Cys	Crouzon	Jabs (1994)
351	TCC-TGC	Ser-Cys	Craniossinostose	Pulleyn (1996)
354	TCT-TGT	Ser-Cys	Crouzon	Reardon (1994)
354	TCT-TAT	Ser-Tyr	Crouzon	Kress (2000)
359	aGTT-TTT	Val-Phe	Jackson-Weiss	Meyers (1996)
362	aGCG-TCG	Ala-Ser	Crouzon	Everett (1999)
372	TCC-TGC	Ser-Cys	Beare-Stevenson cutis gyrata	Przyłepa (1996)
375	TAC-TGC	Tyr-Cys	Beare-Stevenson cutis gyrata	Przyłepa (1996)
384	aGGG-AGG	Gly-Arg	Craniossinostose	Pulleyn (1996)
549	aAAT-CAT	Asn-His	Crouzon	Kan (2002)
565	GAG-GGG	Glu-Gly	Pfeiffer	Kan (2002)
641	AAA-AGA	Lys-Arg	Pfeiffer	Kan (2002)
659	AAGa-AAT	Lys-Asn	Craniossinostose	Kan (2002)
663	GGG-GAG	Gly-Glu	Pfeiffer	Kan (2002)
678	tAGA-GGA	Arg-Gly	Crouzon	Kan (2002)

SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (SPLICING)

IVS	Doador/acceptor	Substituição	Fenótipo	Referência
9	As	A-G	Pfeiffer	Tsukuno (1999)
9	Ds	A-G	Craniossinostose	Mulliken (1999)
10	Ds	G-A	Crouzon	Kan (2002)
3b	As	G-T	Pfeiffer	Jabs (1994)
3b	As	G-C	Pfeiffer	Holloway (1997)
3b	As	A-G	Pfeiffer	Jabs (1994)
3b	As	A-T	Pfeiffer	Passos-Bueno (1999)
3b	As	T-G	Pfeiffer	Jabs (1994)
3c	As	G-A	Pfeiffer	Cornejo-Roldan (1999)

3c	As	G-C	Pfeiffer	Jabs (1994)
3c	As	A-G	Pfeiffer	Lajeunie (1995)
3c	Ds	A-G	Pfeiffer	Cornejo-Roldan (1999)
3c	Ds	G-A	Crouzon	Reardon (1994)

INSERÇÕES PEQUENAS

Códon	Nucleotídeo	Inserção	Fenótipo	Referência
	982	TGG	Crouzon	Meyers (1996)
	1018	GACGCT	Crouzon	Steinberger (1996)
	1263	TCAACA	Pfeiffer	Meyers (1996)

DELEÇÕES PEQUENAS

Códon	Deleção	Fenótipo	Referência
267	ATGCC^TCCACagtggtCGGAGGAGAC	SSC	Paznekas (1998)
272	GGTCGGA^GGAgaGCTAGAGTTTG	Pfeiffer	Priolo (2000)
285	ATGCC^CAGCCccacatccaGTGGATCAAG	Crouzon	Oldridge (1995)
287	AGCCC^CACATccagtggtcaagcacgtGGAAAAGAAC	Pfeiffer	Cornejo-Roldan (1999)
355	TCACTCT^GCAtggtgacaGTTCTGCCAG	Crouzon	Steinberger (1996)

REARRANJOS COMPLEXOS (INCLUINDO INVERÇÕES)

Descrição	Fenótipo	Referência
CG-TT cd. 252 S252F	Apert	Oldridge (1997)
CGC-TCT nt 755-757, Ser252Leu, Pro253Ser	Pfeiffer	Kan (2002)
GC-CT cd. 342 Cys342Ser	Pfeiffer	Cornejo (1999)
GC-TT nt 514-515, Ala172Phe	Pfeiffer	Kan (2002)

INSERÇÕES E DUPLICAÇÕES GRANDES

Descrição	Fenótipo	Referência
Inserção de 368 bp Alu ex. 9 (mutação descrita em nível de DNA genômico)	Apert	Oldridge (1999)
Inserção de ~350 bp Alu ex. 9 (mutação descrita em nível de DNA genômico)	Apert	Oldridge (1999)

1.5.2.3 Gene FGFR3 (OMIM 134934)

O receptor FGFR3 foi o último a ser isolado. KEEGAN et al. (1991) isolaram um cDNA humano de um novo receptor tirosino-quinase que era muito parecido com os outros que já haviam sido descritos anteriormente e denominaram-no de FGFR3.

Estudando a acondroplasia, SHIANG et al. (1994) conseguiram ligar o gene FGFR3 à doença e também localizaram-no no braço curto do cromossomo 4 (4p16). Estudos posteriores (ROUSSEAN et al., 1994; BELLUS et al., 1995) mostraram e comprovaram que mutações no gene FGFR3 realmente eram a causa da acondroplasia.

Descobriu-se também que mutações no gene FGFR3 causavam outros tipos de displasias ósseas (TAVORMINA et al., 1995; ROUSSEAN et al., 1996).

Surpreendentemente, MEYERS et al. (1995) encontraram uma mutação Ala391Glu nesse gene em três famílias diferentes que possuíam o fenótipo da Síndrome de Crouzon e acanthosis nigrans.

Essas associações do gene FGFR3 a diferentes displasias e outras malformações demonstraram seu amplo efeito pleiotrópico e mostraram-no, também, como um locus heterogenético à Síndrome de Crouzon, que já havia sido anteriormente associada ao gene FGFR2.

Em 1996, BELLUS e colaboradores descreveram a mutação P250R no gene FGFR3, hoje a mais associada à craniossinostose (Tabela 4).

Em 1997, MUENKE et al. descreveram uma nova síndrome, distinta das outras com presença de craniossinostose, através do estudo de sessenta e um indivíduos de vinte famílias diferentes, que apresentavam sinostose da sutura coronal e a mutação P250R. MUENKE et al. propuseram que todos os pacientes que apresentavam sinostose coronal fossem testados para essa mutação. A síndrome, que também apresenta outras características clínicas, recebeu o nome de Síndrome Muenke.

Em um estudo com 31 famílias diferentes, com sinais clínicos de SSC, PAZNEKAS et al. (1998) identificaram, em sete delas, a presença da mutação P250R no gene FGFR3. A sobreposição de sinais clínicos e a presença de mutações nos mesmos genes que levariam a mais de uma condição com craniossinostose, tais como SSC, Crouzon e Pfeiffer, sugeriram que o gene TWIST e os genes FGFRs, são componentes da mesma via molecular envolvida na modulação do desenvolvimento craniofacial e dos membros em humanos.

Muitos estudos mostraram que a mutação P250R também provocava outros fenótipos com sinais clínicos variados (GOLLA et al., 1997; GRIPP et al., 1998; HOLLWAY et al., 1998; LAJEUNIE et al., 1999).

PEREZ-CASTRO et al. (1997) descreveram que o gene FGFR3 continha 19 exons, 23 introns confirmados, sendo 16 alternativos, compreendendo 16.5kb.

Até o momento foram descritos 7 transcritos diferentes e 7 isoformas da proteína, mas acredita-se que a completa natureza do gene ainda não foi toda elucidada.

O mRNA desse gene é encontrado no desenvolvimento do sistema nervoso central, e está também presente nos precursores de cartilagens e ossos, durante o período de ossificação endocondral, mas não na cartilagem hipertrófica. Uma isoforma é encontrada no cérebro.

A variante Fgfr3b é fracamente expressa em muitas cartilagens da cabeça, enquanto o Fgfr3c o é fortemente. A maioria dessas cartilagens não contribui para os ossos da calvária, que se formam diretamente do mesênquima. Fgfr3c também foi detectado com baixa intensidade no periósteo da cabeça e frente osteogênica frontal (RICE et al., 2000).

Tabela 4 Mutações encontradas no gene FGFR3

SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (MISSENSE/NONSENSE)				
Códon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referência
250	CCG-CGG	Pro-Arg	Craniossinostose	Bellus (1996)
391	GCG-GAG	Ala-Glu	Síndrome Crouzon	Meyers (1995)

1.5.3 Gene MSX2 (OMIM123101)

O gene MSX2 foi o primeiro locus gênico mapeado que envolvia a formação das suturas e foi identificado através de uma família com craniossinostose tipo Boston. A análise de ligação nessa família de três gerações de afetados permitiu a descoberta do locus na parte distal do braço longo do cromossomo 5 (MULLER et al., 1993).

Em 1993, LI e colaboradores clonaram e seqüenciaram o gene humano MSX2. Utilizando hibridização *in situ*, mapearam o gene na mesma região do cromossoma 5 na qual uma forma de craniossionostose já havia sido mapeada. No mesmo estudo, encontraram uma substituição de uma prolina por uma histidina no homeodomínio do gene MSX2 (P148H) em todos os membros de uma família em Boston, afetados com craniossinostoses, previamente descrita por WARMAN et al. (1993) e MULLER et al. (1993). Esse resíduo de prolina é conservado em todos os genes MSX em organismos diversos como insetos e humanos. LI et al. (1993) alegaram que essa seria a primeira

descrição de mutação em um gene com *homeobox* associada a uma doença humana. WILKIE et al. (2000) descreveram mutações heterozigotas no MSX2 em três famílias diferentes com forame parietal alargado. A mutação causaria redução da atividade do gene. Esses achados contrastam com os feitos na descrição da mutação P148H no MSX2 que leva à craniossinostose, pois, nesse último caso, ocorre aumento da afinidade do gene ao mesmo alvo. Nesse mesmo estudo, os autores concluíram que a dosagem do MSX2 é crítica para o desenvolvimento ósseo e sugeriram que o forame parietal alargado e craniossinostose resultam, respectivamente, de perda e ganho de atividade na via mediada pelo MSX2 na diferenciação osteogênica da calvária.

A substituição do P148H ocorre na parte conservada do homeodomínio que está envolvido na interação entre DNA e proteínas. A troca altera a estrutura terciária do produto gênico do MSX2 e altera a sua afinidade. Trabalhos recentes (MA et al., 1996) mostraram que a mutação confere uma maior afinidade de ligação do DNA, com uma taxa reduzida de dissociação, sem alterar a especificidade do alvo.

O gene MSX2 está envolvido na formação da sutura e sua prolongada expressão acelera o seu fechamento. De acordo com esse modelo, a mutação P148H resulta em ganho de função.

No rato, o MSX2 é primeiramente expresso nas suturas da calvária, mas também no coração, broto dos membros, vesícula óptica e vesícula ótica.

Durante o desenvolvimento embrionário, o MSX2 é primeiramente expresso no ectoderma e depois no mesoderma. O produto gênico desse gene parece estar envolvido nas interações entre as células epiteliais e mesenquimais.

Um nível crítico da atividade desse gene estabelece um balanço entre sobrevivência e apoptose das células derivadas da crista neural, necessárias à promoção da morfogênese craniofacial. Essa proteína promove crescimento celular sob algumas condições e pode ser um importante alvo da via de sinalização RAS.

O gene MSX2 pertence à classe de genes com homeodomínios que se ligam tanto ao DNA como às proteínas. Estes homeodomínios são extremamente conservados entre as espécies e através da evolução. O gene cobre 6.33kb do genoma humano, possui apenas 2 exons e 4 introns confirmados, todos alternativos. De acordo com análises, esse gene possui apenas um transcrito.

O MSX2 faz parte de uma via conservada do desenvolvimento na qual as proteínas do MSX agiriam como repressores transcricionais (ZHANG et al., 1997).

Na tabela 5, as mutações encontradas no MSX2.

Tabela 5 Mutações encontradas no gene MSX2

SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA (MISSENSE/NONSENSE)				
Códon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referência
148	CCC-CAC	Pro-His	Craniossinostose	Jabs (1993)
154	CTC-CCC	Leu-Pro	Forame parietal	Wuyts (2000)
172	CGT-CAT	Arg-His	Forame parietal alargado	Wilkie (2000)

1.6 Mecanismo de Regulação da Formação das Suturas Cranianas

A craniossinostose ocorre como resultado da perturbação do equilíbrio entre os fatores envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose das células da sutura craniana.

É importante observar a distribuição e localização das proteínas envolvidas na morfogênese da sutura, para entender o mecanismo e regulação durante a fusão precoce (Figura 6).

O mecanismo de formação da sutura é um processo equilibrado por proteínas estimuladoras e inibitórias do processo de crescimento. Através da modulação de expressão entre estas proteínas é que temos o desenvolvimento harmônico dos ossos da calvária.

Antes da formação da sutura, as proteínas TWIST, BMP-4 e 7, FGF-9 e MSX1 e 2 estão envolvidas na sinalização epitélio-mesênquimal no mesênquima sutural, na dura mater e nas frentes osteogênicas de aproximação. Também estão presentes nessas áreas as proteínas FGFR 1, 2 e 3. A FGFR2 não está presente na sutura e dura mater, ao contrário de sua grande expressão nas frentes osteogênicas de aproximação. As proteínas TGF- β 1, 2 e 3 estão presentes na dura mater e nas frentes osteogênicas de aproximação, mas ausentes no mesênquima sutural (OPPERMAN, 2000).

Durante o processo de aproximação e sobreposição das frentes osteogênicas, fatores envolvidos na estrutura de formação, como SHH, PTC e ID estão presentes,

enquanto que o TWIST e MSX2 estão regulados negativamente. Após algum tempo, pode-se observar distribuição diferencial dos componentes da matriz extracelular, com CBFA1, BSP-I, BSP-II, Colágeno tipo I, ON e AP encontrados no osso e Colágeno tipo I e tipo III expressos nas frentes osteogênicas, junto com FGFR1 a 3 e TGF- β 1, 2 e 3. A matriz da sutura mostra principalmente expressão do colágeno tipo III e FGF-9, MSX1 e início da expressão do FGFR1.

Os fatores que regulam positivamente a matriz da sutura são o colágeno tipo I, TGF- β 1 e β 2, FGFR1, FGFR2 e BSP-I, enquanto CBFA1, FGF-2 e IGF-1 tornam-se expressos na frente osteogênicas. Os fatores MSX1, ID, SHH, PTH e FGF-9 estão regulados negativamente (OPPERMAN, 2000).

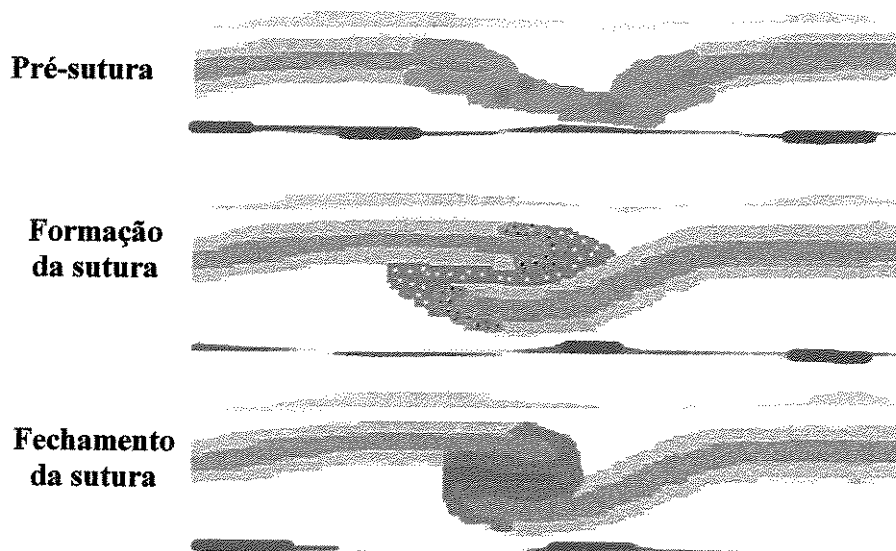


Figura 6 Locais de ação e proteínas envolvidas no processo de ossificação dos ossos da calvária (OPPERMAN, 2000).

	FGFR1c, FGFR2, FGFR3c, Colágeno tipo I, BMP-4, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3		TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, FGFR3c, MSX1, MSX2, FGF-2, FGFR1, FGF-9, BMP-4, BMP-7
	BSP-I, BSP-II, Colágeno tipo I, FGF-2, ON, AP		TWIST, Colágeno tipo III, MSX1, MSX2, BMP-4, BMP-7, FGF-4, FGF-9
	MSX2, TGF- β 1, TGF- β 3, FGFR1c, FGFR3c, FGFR2b&c, ID, Colágeno tipo I & III, AP, BMP-2, BMP-7		MSX1, Colágeno tipo III, FGFR1, FGF-9
	FGFR1, FGFR2c, FGFR3c, ID, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Colágeno tipo I & III, SHH, PTC, BMP-4, MSX2, AP, CBFA-1		Colágeno tipo I, TGF- β 1, TGF- β 2, FGFR1, FGFR2, MSX2, OC, BSP-I
	TGF- β 1, TGF- β 2, Colágeno tipo I & III, FGF-2, IGF-I, BSP-I, OC, CBFA1		

Sabe-se que os níveis de FGF-2 são muito elevados na fusão das suturas (MOST et al., 1998) e a adição desse fator irá realmente induzir o fechamento (ISEKI et al., 1997). Esse mesmo fator também age sobre o TGF- β 2. Estudos recentes demonstraram que o TGF- β 2 induz também o fechamento da sutura por elevação dos níveis de proliferação celular (OPPERMAN et al., 1998). Já o TGF- β 3 parece agir de modo contrário ao β 2 (OPPERMAN et al., 2000).

Existem boas evidências de que o MSX2 e os TGF- β s controlam o fechamento da sutura em parte, através da regulação da proliferação celular. Entretanto, parece que a maioria das mutações nos FGFRs não afetam a atividade proliferativa, mas sim alteram a diferenciação celular. O aumento da proliferação celular na sutura contribui com mais células na linhagem celular do osso e acelera a diferenciação dos osteoblastos, ambos resultando em aumento na formação óssea. Portanto, uma regulação negativa sobre qualquer um dos processos pode ser suficiente para induzir uma fusão prematura.

RICE et al. (2000) e OPPERMAN (2000) propuseram que as FGF inibem o TWIST, que tem função de regular negativamente os FGFRs, modulando sua atividade. Com as mutações no gene TWIST, ocorreria aumento de expressão dos FGFR, levando à maturação precoce das células mesenquimais em osteoblastos maduros, com conseqüente fusão das suturas.

Outro evento que também ocorre para a manutenção normal da sutura e que pode estar alterado no caso das craniossinostoses é a apoptose celular. Há genes que controlam a proliferação, outros a diferenciação e há também aqueles que controlam a apoptose. Mas esses serão mais referidos na formação dos membros.

Todos esses dados fornecem uma boa evidência do número elevado de genes e proteínas anormais que podem contribuir para um fechamento prematuro das suturas cranianas. O desenvolvimento normal e harmônico dos ossos da calvária é regulado por um complexo mecanismo no qual estão presentes fatores de crescimento, transcrição, entre outros, e esses podem agir na mesma via ou em vias independentes (Figura 7).

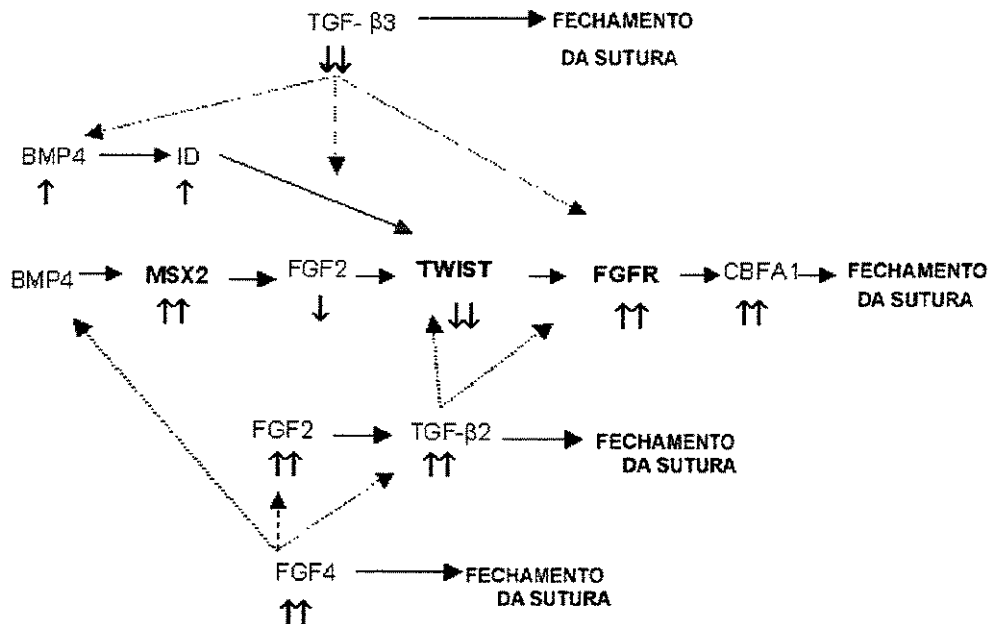


Figura 7 Representação esquemática de associações conhecidas (setas contínuas), e pouco conhecidas (setas descontínuas) entre fatores ligados a craniossinostoses. O número de setas curtas mostra o grau de regulação positiva (↑) ou regulação negativa (↓) de cada fator resultando em craniossinostose (OPPERMAN, 2000).

1.7 Mecanismo de Regulação da Formação dos Membros

Os dígitos dos membros são resultado também de um processo complexo em que sinais de morte e sobrevivência celulares são mediados por diferentes fatores de crescimento.

Proteínas que agem no desenvolvimento das suturas cranianas também agem na regulação da formação dos membros, por isso em muitas craniossinostoses síndrômicas há a presença de membros anormais.

As BMPs constituem uma grande família de fatores de crescimento pertencentes à superfamília TGF-β. Membros da família BMP atuam no desenvolvimento dos membros.

As BMP-2, BMP-4 e BMP-7 são expressas no mesoderma indiferenciado dos membros, ectoderma apical e mesênquima interdigital. Entre as funções atribuídas a essas BMPs estão o controle da proliferação celular, a regulação do crescimento e regressão de AER, diferenciação condrogênica, controle da formação dos músculos, indução de apoptose e, possivelmente, regulação do eixo anteroposterior do membro primitivo (MACIAS et al., 1997, MERINO et al., 1999).

Acredita-se que a proteína morfogênica SHH (KIM et al., 1998) produzida na região de desenvolvimento dos dígitos, seja responsável pelo início e expressão sustentada das BMPs. Essa proteína determinaria a região do membro competente para formação dos dígitos, estabelecendo a inicialização de células da região, determinando também o controle do seu número e identidade de cada um dos dígitos, através da modulação das BMPs.

A BMP-4 induz à morte por apoptose no mesoderma indiferenciado dos membros (MONTERO et al., 2001), particularmente na região interdigital, onde há co-expressão entre genes BMP e MSX, mas somente em áreas com baixa expressão de FGF que, aparentemente, protege as outras áreas da apoptose.

A sinalização dos FGFs nos membros em crescimento é mediada pelos FGFRs com alta afinidade. Alterações digitais podem ser resultadas de mutações do receptor, com o aumento da sua afinidade ao FGF, levando à sua superativação. Esses eventos causam migração anormal das células embrionárias mesenquimais, com formação de condensações mesenquimais aberrantes, levando ao desenvolvimento de dedos anormais (NASKI e ORNITZ, 1998).

Assim, a interação entre essas diferentes proteínas leva à formação dos dedos a partir do desenvolvimento de áreas específicas e apoptose da região interdigital.

1.8 Investigação de craniossinostoses

A investigação molecular de craniossinostoses vem sendo complicada pela extensa e complexa via de regulação gênica e pela diversidade clínica e molecular descrita anteriormente. Por outro lado, é sabido que as frequências desse grupo de

condições clínicas é similar em diferentes populações, independente de sua etnia. Assim, alguns estudos foram realizados visando a caracterizar os principais pontos de concentração de mutações e determinar estratégias de investigação (MUENKE e SCHELL, 1995; PAZNEKAS et al., 1998; KAN et al., 2002; CHUN et al., 2003).

Recentemente, CHUN et al. (2003), em um artigo intitulado "Screening of Patients with Craniosynostosis: Molecular Strategy", propuseram um algoritmo para pesquisa molecular em pacientes com craniossinostose, a fim de que esse se tornasse mais eficiente e de menor custo, o qual se encontra na figura 8.

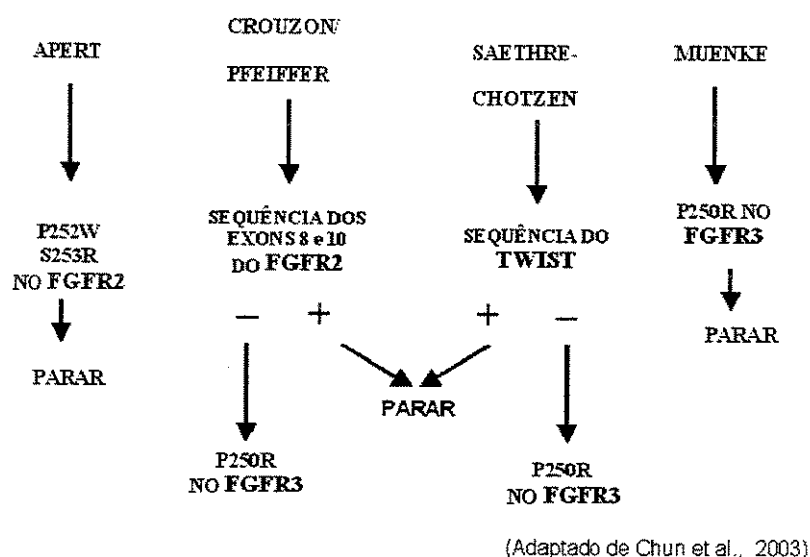


Figura 8 Algoritmo para investigação de craniossinostoses síndrômicas

A utilização dessa proposta de investigação poderá identificar sua eficiência e limitações, em diferentes casuísticas. Nesse estudo, tomou-se como base essa estratégia diagnóstica para investigação de indivíduos atendidos em serviço para diagnóstico e aconselhamento genético de anomalias craniofaciais.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Tendo em vista a diversidade clínica e etiológica das craniossinostoses, este estudo objetivou:

1. Investigar em famílias e casos isolados de craniossinostoses sindrômicas conhecidas ou não, e em indivíduos com evidências clínicas de fechamento precoce de suturas cranianas, a presença de mutações nas seguintes regiões cromossômicas:

- a. Exon 1 do gene TWIST
- b. Exons 8 e 10 do gene FGFR2.
- c. Mutação Pro250Arg do gene FGFR3

2. Investigar a mutação Pro252Arg do gene FGFR1 em famílias e casos isolados com quadros clínicos compatíveis ao da Síndrome Pfeiffer.

3. Investigar as mutações Pro148His e Leu154Pro do gene MSX2 em famílias e casos isolados com forame parietal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

A casuística foi obtida, em sua maioria, no Ambulatório de Dismorfologia Craniofacial do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que funciona no Hospital de Clínicas da mesma Instituição. Trata-se de ambulatório para diagnóstico e aconselhamento genético em anomalias craniofaciais estabelecido em hospital terciário não especializado na área. Quatro casos foram encaminhados pelo Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da USP – Ribeirão Preto (família 8 e casos isolados 5 e 6) e dois casos (família 6 e caso isolado 3) foram encaminhados pelo Serviço de Genética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP (HRAC, Centrinho, Bauru). Também foram encaminhados casos de Botucatu e Rio de Janeiro.

Anteriormente a este estudo, foi realizada a avaliação genético-clínica e citogenética de todos os participantes e de parentes em primeiro grau interessados. Foram incluídos no estudo 13 famílias e 8 casos isolados, totalizando 21 casos. Destes, 15 apresentavam quadros clinicamente reconhecidos como de craniossinostoses síndrômicas e 5 apresentavam evidências de fechamento precoce de suturas, por conta do formato de crânio, porém sem relato de craniossinostose corrigida cirurgicamente. Neste grupo, não havia sido determinada a etiologia do quadro por meio de estudo dismorfológico padrão (AASE, 1990) ou citogenético rotineiro.

A tabela abaixo resume os possíveis diagnósticos clínicos dos indivíduos, de acordo com seus sinais fenotípicos e em anexo encontram-se os heredogramas dos casos familiares (anexo 1).

Tabela 6 Hipóteses diagnósticas da presente casuística.

Casuística	Possíveis diagnósticos clínicos
Família 1	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 2	Síndrome de Saethre-Chotzen, presença de forame parietal
Família 3	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 4	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 5	Síndrome Pfeiffer tipo III
Família 6	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 7	Quadro sindrômico não esclarecido com braquicefalia acentuada, deficiência mental e dismorfismos faciais.
Família 8	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 9	Síndrome de Saethre-Chotzen
Família 10	Quadro sindrômico não esclarecido de recorrência familiar com craniossinostose coronal, assimetria facial, alterações dentárias e esqueléticas.
Família 11	Quadro sindrômico não esclarecido de recorrência familiar com craniossinostose coronal, braquicefalia, alargamento de háluces e polegares.
Família 12	Síndrome de Crouzon
Família 13	Presença de Forame parietal
Caso isolado 1	Craniossinostose com hábito marfóide e deficiência mental.
Caso isolado 2	Craniossinostose coronal isolada
Caso isolado 3	Síndrome de Saethre-Chotzen
Caso isolado 4	Síndrome de Saethre-Chotzen
Caso isolado 5	Síndrome Pfeiffer tipo II
Caso isolado 6	Síndrome de Saethre-Chotzen
Caso isolado 7	Síndrome de Apert
Caso isolado 8	Síndrome Pfeiffer tipo I

3.2 Estudo laboratorial

Todos os indivíduos tiveram sua participação previamente autorizada por eles próprios ou pelos seus responsáveis, mediante assinatura do consentimento livre e esclarecido (anexo 2), após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (processo no. 129/98 e 488/2002).

O estudo de cariótipo foi feito no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Medicina – UNICAMP.

O estudo molecular foi executado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP.

3.2.1 Estudo Citogenético

Foram coletados dos probandos de cada família e dos casos isolados, 5ml de sangue periférico em seringa descartável com 0,4 ml de heparina e encaminhados ao Laboratório de Citogenética, para a cultura de linfócitos e realização do cariótipo com bandamento G (resolução de aproximadamente 500 bandas), para análise conforme a rotina do laboratório.

3.2.2 Extração de DNA genômico a partir de sangue total

Utilizaram-se amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total dos probandos e de seus familiares. Foram coletados de 10 a 20ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico dihidratado) a 10 % pH 8,0 como anticoagulante.

Adicionou-se Solução A ao sangue coletado até o volume de 50ml e manteve-se o tubo a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado ('pellet') em 20ml de Solução A. Após a

repetição da operação o 'pellet' foi ressuspenso em 1ml de Solução B diluída para 1x. Acrescentaram-se 250µl de Solução C, contendo Proteinase K (ARAÚJO et al., 1996).

Na tabela abaixo as soluções para extração de DNA.

Tabela 7 Soluções para extração de DNA

Solução A	Solução B (estoque 2x):	Solução C (recém preparada)
	[] final	[] final
MgCl ₂5mM	Na ₂ EDTA.....20mM	SoluçãoB.....0,5x
Sacarose.....0,32M	NaCl.....20mM	SDS.....5 %
Tris-HCl pH 8,0 ...10mM	Tris-HCl,pH8,0....20mM	Proteinase K....1 mg/ml
Triton-X 100.....1 %		

Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 65°C, por 2 horas. Para a extração do DNA, adicionou-se 1,25ml de TE 1x (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Applied Biosystems).

Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o qual centrifugou-se a 2.500rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10mM, pH 8,0 seguido de centrifugação, repetindo-se o procedimento duas vezes com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1;v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3M e 2,5x o volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% antes de ser ressuspenso em volume que variou de 200-500µl de TE 1x. A concentração de DNA obtida foi calculada através de leitura de absorbância a 260nm em espectrofotômetro, sendo a integridade do DNA testada em eletroforese com gel de agarose 0,8%.

3.2.3 Estudo molecular

O estudo molecular foi baseado no algoritmo proposto por CHUN et al., 2003 e em outros estudos anteriormente descritos.

3.2.3.1 Gene TWIST

1) PCR

Utilizou-se a técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do exon 1 do gene TWIST. Para isso o exon foi dividido em dois fragmentos intitulados Twist 1 (TW1) e Twist 2 (TW2). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados, anteriormente descritos por HOWARD et al (1997), a temperatura de anelamento (T_m) e o tamanho dos fragmentos amplificados por cada par de *primers* são mostrados na tabela 8:

Tabela 8 Seqüência de *primers* para amplificação do gene TWIST

	Primers 5' → 3'	T_m (°C)	Tamanho (pb)
TW1	TW1s - GAG GCG CCC CGC TCT TCT CC	62	375
	TW1as - AGC TCC TCG TAA GAC TGC GGA C		
TW2	TW2s - CAA GAA GTC TGC GGG CTG TG	65	512
	TW2as - AAT CGA GGT GGA CTG GGA ACC G		

A amplificação dos fragmentos de DNA foi obtida utilizando o seguinte protocolo:

- ▶ 31,7µl H₂O
- ▶ 5µl Tampão (10X)
- ▶ 1,5 µl MgCl₂ (50µM)
- ▶ 5µl dNTP (2µM)
- ▶ 1µl *primer sense* (20pmoles)
- ▶ 1µl *primer antisense* (20pmoles)
- ▶ 5µl DMSO₄
- ▶ 0,3µl *Taq* DNA Polimerase (5U)
- ▶ 1µl DNA (200-500ng) em 50µl de reação de PCR

As condições para a amplificação dos fragmentos estão na Figura 9.

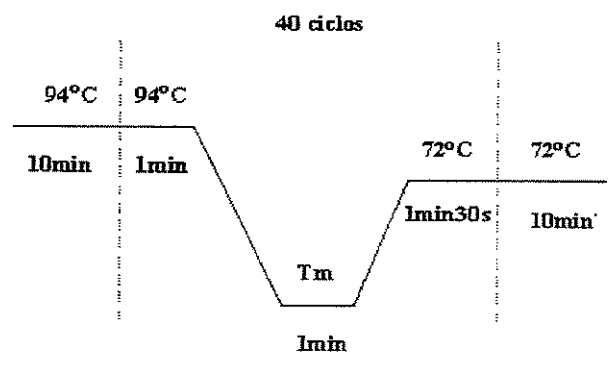


Figura 9 Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos TW1e TW2

2) Clonagem

Antes do sequenciamento do fragmento TW2, foi necessário que esse fosse clonado para a obtenção de melhores resultados. Para a clonagem foi utilizado o kit pGEM-Teasy Vector System I (Promega). Este kit permite a clonagem rápida e eficiente de fragmentos anteriormente amplificados pela técnica de PCR.

Etapas da clonagem:

► Ligação

Os fragmentos TW2 amplificados pela PCR foram utilizados com inserto na ligação ao plasmídeo. Na ligação do inserto ao plasmídeo utilizou-se 3,5µl de produto de PCR, 0,5µl do vetor pGEM (50ng/µl), 5µl de tampão 2X *Rapid Ligation* e 1µl da enzima T4 DNA ligase (3U/µl). A reação foi incubada a 4°C durante a noite.

► Transformação

Após a reação de ligação, era necessário que o DNA plasmidial com o inserto de interesse fosse introduzido em células bacterianas. Para isso foram usadas células competentes da linhagem DH5α (HANAHAN, 1983) anteriormente preparadas segundo protocolo descrito por NISHIMURA et al. (1990). A incorporação do plasmídeo contendo o inserto pelas células DH5α foi desencadeada após choque térmico. Adicionaram-se 5µl da reação de ligação em 100µl de células competentes e incubou-se em gelo por 30 minutos. Logo após promoveu-se a transformação, colocando-se as células em banho a 42°C por 1 minuto. As amostras foram levadas de volta ao gelo por mais 2 minutos.

Decorrido o tempo, acrescentaram-se 900µl de meio LB e incubaram-se as amostras a 37°C sob agitação durante uma hora. Depois de crescidas, 200µl de células supostamente transformadas foram espalhadas em placas contendo 20ml de meio LB ágar e ampicilina (25mg/ml). Foram espalhados nas placas 14µl de Xgal (50mg/ml) e 50µl de água destilada antes de serem colocadas as células transformadas.

A ampicilina foi utilizada para selecionar as bactérias transformadas, pois somente o plasmídeo contém informação que confere resistência a este antibiótico. O vetor pGEm possui também o gene da β-galactosidade, o que permite selecionar além das colônias transformadas, aquelas em que o plasmídeo possui o inserto. Através do X-gal podemos distinguir as colônias recombinantes, que ficam brancas, daquelas não recombinantes, azuis.

► Isolamento

As colônias que continham o inserto foram selecionadas e colocadas para crescer em agitador com 5ml de meio LB líquido e 10µl de ampicilina durante 12 horas a 37°C.

► Extração de plasmídeo em pequena escala (Mini preparação)

Para a extração dos plasmídeos, primeiramente, 1,5ml de cada cultura foi transferida para tubos e centrifugados por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 100µl de solução 1 (tabela abaixo), agitou-se em vortex e deixou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µl de solução 2. Agitou-se por inversão e incubou-se por mais 5 minutos. Foram adicionados 300µl de solução 3, agitou-se por inversão e incubou-se em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. No novo tubo, adicionaram-se 80µl de isopropanol 75% e centrifugou-se por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante e ao pellet adicionaram-se 150µl de etanol. Centrifugou-se uma última vez e o sobrenadante foi descartado, deixando-se o pellet secar à temperatura ambiente. Foram adicionados 30µl de TE 1X com Rnase.

Tabela 9 Soluções para a mini preparação

Solução 1	Solução 2	Solução 3
2,5ml de glicose 1M	1ml de SDS 20%	11,5ml de ac. Acético
1ml de EDTA 0,5M	400µl de NaOH	60ml de Kac 5M
0,625ml de Tris-HCl pH 8 2M	Completar com H ₂ O para 20ml	Completar com H ₂ O para 100ml
Completar com H ₂ O para 50ml		

Após a extração dos plasmídeos, esses foram testados pela técnica de PCR para confirmar a presença do inserto e então serem utilizados no seqüenciamento.

3) Seqüenciamento automático

Tendo em vista que o gene TWIST apresenta muitas mutações diferentes que podem levar a quadros com craniossinostose, optou-se por seqüenciar todo o exon 1. Para isso, utilizou-se a técnica de seqüenciamento automático.

Depois de amplificados os produtos de PCR do TW1, esses foram purificados, no intuito de remover o DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes. Já o TW2 foi seqüenciado diretamente do mini prep. Os *primers* utilizados foram os específicos para o vetor pGEM, denominados T7 e SP6.

Foi utilizado o kit de seqüenciamento Big Dye Terminator Cycle v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) e os componentes e volumes da reação foram os seguintes:

- ▶ 2µl Big Dye
- ▶ 5pmoles Primer
- ▶ 1-2µl PCR purificado
- ▶ q.s.p. 10µl H₂O

O ciclo utilizado no seqüenciamento está representado na figura 10.

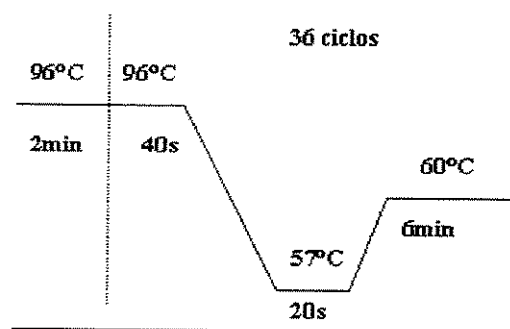


Figura 10 Ciclos utilizados nas reações de seqüenciamento automático

Depois de prontos os produtos da PCR foram purificados utilizando-se isopropanol e etanol, no intuito de se removerem as bandas inespecíficas que pudessem atrapalhar o seqüenciamento.

Foi utilizado o seqüenciador ABI Prism™ 377 para a determinação da seqüência linear do exon 1 do TWIST. Os dados foram analisados com os softwares Sequencing Analysis e GeneScan™.

Depois de analisados, os dados foram lidos utilizando-se os softwares Chromas e GeneRunner.

3.2.3.2 Gene FGFR1

1) PCR

Para investigação da mutação P252R do gene FGFR1, utilizaram-se dados da literatura, sendo que os *primers* (Tabela 10) foram desenhados baseados na seqüência do gene depositada no DNA databank (número de acesso: AY585209) e a digestão enzimática foi baseada no artigo de MUENKE et al., 1994.

Tabela 10 Sequência de *primers* para amplificação do gene FGFR1

	Primers 5' → 3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
FGFR1	sense - GTG CCT CCT CTC CCA TCT TC	60	216
	antisense - CAA GAT CTG GAC ATA AGG CAG		

Os componentes e volumes para a amplificação do exon 5 do FGFR1 foram:

- ▶ 29,1µl H₂O
- ▶ 5µl Tampão (10X)
- ▶ 1,5 µl MgCl₂ (50µM)
- ▶ 5µl dNTP (2µM)
- ▶ 1µl *primer sense* (20pmoles)
- ▶ 1µl *primer antisense* (20pmoles)
- ▶ 5µl DMSO₄
- ▶ 0,3µl *Taq* DNA Polimerase (5U)
- ▶ 1µl DNA (200-500ng) em 50µl de reação de PCR

O ciclo utilizado na PCR está representado na figura 11.

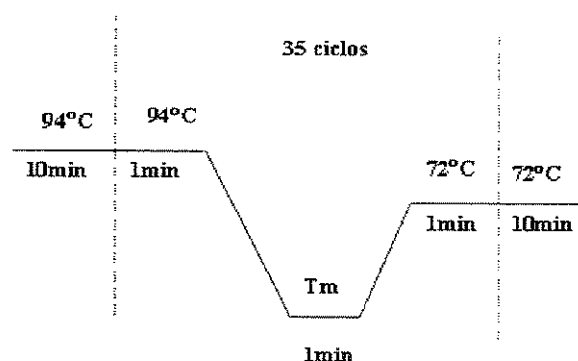


Figura 11 Ciclos utilizados na amplificação do exon 5 do FGFR1

2) Digestão enzimática

Após amplificação do exon 5, este foi digerido com a enzima de restrição *Mnl* I (New England) para busca da mutação P252R segundo as especificações do fabricante. A digestão foi feita perfazendo um volume final de 30µl:

- ▶ 9µl de PCR
- ▶ 3µl tampão da enzima
- ▶ 0,6µl enzima *Mnl* I

As amostras permaneceram em banho-maria a 37°C por 2 horas e os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, sob iluminação ultravioleta e fotografados.

3.2.3.3 Gene FGFR2

1) PCR

Neste gene, foram amplificados os exons IIIa (exon 8) e IIIc (exon 10). Utilizaram-se os *primers* anteriormente descritos por KAN et al., 2002 (Tabela 11).

Tabela 11 Seqüência de *primers* para amplificação do gene FGFR2

	Primers 5' → 3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
Exon 8	Ex8s - GGT CTC TCA TTC TCC CAT CCC	62	325
	Ex8as - CCA ACA GGA AAT CAA AGA ACC		
Exon 10	Ex10s - CCT CCA CAA TCA TTC CTG TGT	62	257
	Ex10as - ATA GCA GTC AAC CAA GAA AAG GG		

Os componentes e volumes da reação em cadeia da polimerase para ambos os exons foram os seguintes:

- ▶ 20,4µl H₂O
- ▶ 3µl Tampão (10X)
- ▶ 0,5µl MgCl₂ (50µM)
- ▶ 2,5µl dNTP (2µM)
- ▶ 1µl *primer sense* (20pmoles)
- ▶ 1µl *primer antisense* (20pmoles)
- ▶ 0,2 µl *Taq* DNA Polimerase (5U)
- ▶ 1µl DNA (200-500ng) em 30µl de reação de PCR

Os ciclos utilizados na PCR estão representados na figura 12.

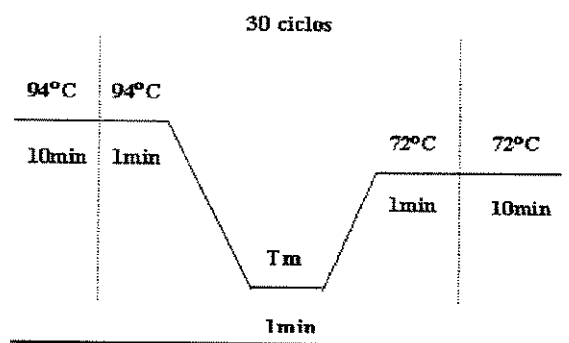


Figura 12 Ciclos utilizados na amplificação dos exons 8 e 10 do FGFR2

2) Sequenciamento manual

Depois de amplificados, ambos os exons foram investigados, utilizando-se sequenciamento direto. O produto de PCR foi purificado, com a finalidade de remover o DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes:

- ▶ 7µl da reação de PCR purificada
- ▶ 1µl do *primer* (sense ou antisense) ~ 2 pmoles
- ▶ 2µl de reaction buffer 10X
- ▶ 2µl enzima *Thermo Sequenase* (4U/µl)
- ▶ 8µl de H₂O

Transferiram-se 4,5 µl da reação para quatro tubos, cada um contendo 0,06µM de um dos ddNTP (α -³³P) e 6 µM de mistura de dNTPs, num volume final de 7µl. Submeteu-se a reação à seguinte ciclagem:

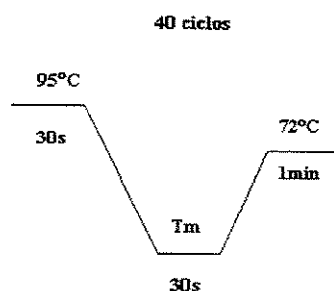


Figura 13 Ciclagem da reação do sequenciamento. A temperatura de anelamento é correspondente ao *primer* utilizado em cada reação.

No final da reação, acrescentaram-se 4 µl de Solução de Terminação contendo 95% de formamida, 0,05% de Azul de bromofenol e 20 mM de EDTA.

Separou-se a reação de seqüenciamento em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 7% contendo uréia 7M, com variação de espessura de 0,1- 0,4mm:

- ▶ 17,5ml Acrilamida: Bisacrilamida 40%
- ▶ 10ml TBE 10x
- ▶ 106g Uréia
- ▶ 100ml H₂O q.s.p

Os parâmetros de corrida foram 2.000 V, 50 mA a 50 W, com duração de 3 horas (corridas curtas) e 6 horas (corridas longas) dependendo do tamanho e da região do fragmento em estudo. Posteriormente, foi exposto a filme de raio-X sensível à emissão de radiação do nucleotídeo marcado (por exemplo, Kodak X-Omat AR), por tempo variável. A revelação do filme foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.3.4 Gene FGFR3

1) PCR

O exon 7 do gene FGFR3 foi amplificado utilizando-se *primers* (Tabela 12) baseados na seqüência do gene depositada no DNA databank (número de acesso: NT006125)

Tabela 12 Seqüência de *primers* para amplificação do gene FGFR3

Primers 5' → 3'		T _m (°C)	Tamanho (pb)
FGFR3	sense - GTG GAG CCT GGT CAT GGA AAG antisense - CCA AAT CCT CAC GCA ACC C	65	483

A reação estabelecida foi a seguinte:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| ▶ 29,1µl H ₂ O | ▶ 1µl <i>primer antisense</i> (20pmoles) |
| ▶ 5µl Tampão (10X) | ▶ 5µl DMSO ₄ |
| ▶ 1,5µl MgCl ₂ (50µM) | ▶ 1µl <i>Taq</i> DNA Polimerase (5U) |
| ▶ 5µl dNTP (2µM) | ▶ 1µl DNA (200-500ng) em 50µl |
| ▶ 1µl <i>primer sense</i> (20pmoles) | de reação de PCR |

A PCR teve os seguintes ciclos:

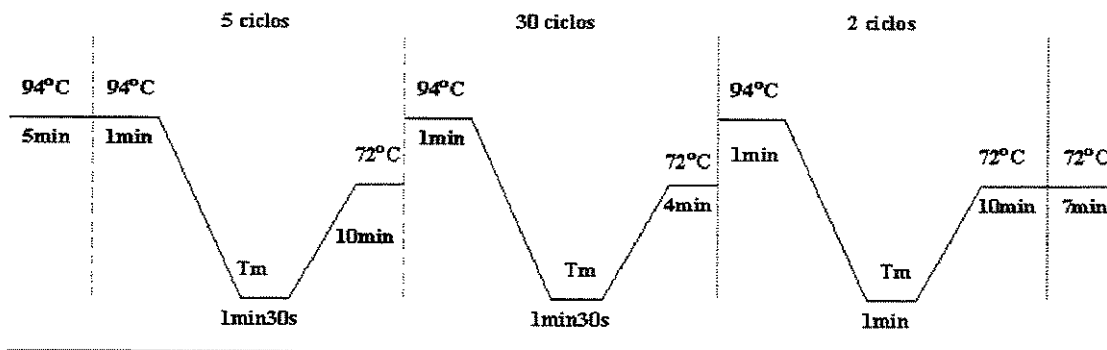


Figura 14 Ciclos utilizados na amplificação do exon 7 do gene FGFR3

2) Digestão Enzimática

Após amplificação do exon 7, este foi digerido com a enzima de restrição *Nci* I (New England Biolabs) para busca da mutação P250R. A reação de digestão foi feita perfazendo um volume final de 50 µl. A reação foi realizada por 2 horas a 37°C da seguinte forma:

- ▶ 10µl PCR
- ▶ 5µl Tampão da enzima (diluído 450µl Tampão + 50µl H₂O)
- ▶ 1µl Enzima *Nci* I

Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e os fragmentos da digestão foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados.

3.2.3.5 Gene MSX2

1) PCR

O exon 2 do gene MSX2 foi amplificado utilizando-se *primers* (Tabela 13) baseados na sequência do gene depositada no DNA databank (número de acesso: L22499.1).

Tabela 13 Sequência de *primers* para amplificação do gene MSX2

	Primers 5' → 3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
MSX2	sense - TGC ACC CTG AGG AAA CAC AA	57	198
	antisense - TCT TTT CGC CTT GGC CCT		

Investigou-se a única mutação descrita no caso de craniossinostose: Pro148His (Craniossinostose tipo Boston) e outra mutação responsável pela presença de Forame Parietal, a Leu154Pro.

A amplificação do fragmento de DNA foi obtida utilizando o protocolo descrito abaixo. As condições para a amplificação dos fragmentos estão na Figura 15. Os componentes e volumes foram os seguintes:

- ▶ 20,4µl H₂O
- ▶ 3µl Tampão (10X)
- ▶ 0,9µl MgCl₂ (50µM)
- ▶ 2,5µl dNTP (2µM)
- ▶ 1µl *primer sense* (20pmoles)
- ▶ 1µl *primer antisense* (20pmoles)
- ▶ 0,3µl *Taq* DNA Polimerase (5U)
- ▶ 1µl DNA (200-500ng) em 30µl de reação de PCR

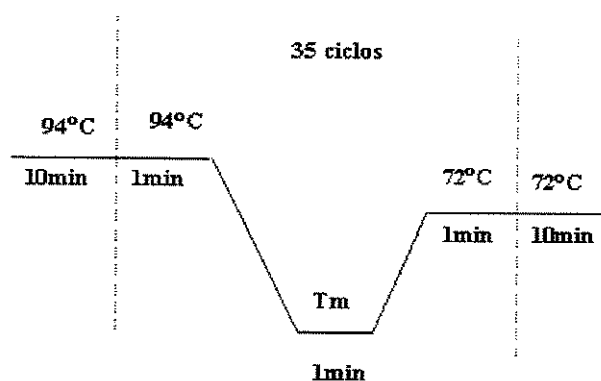


Figura 15 Ciclos utilizados na amplificação do fragmento do MSX2

2) Seqüenciamento automático

O fragmento do gene MSX2 foi completamente seqüenciado para a busca das duas principais mutações. Para tanto foram feitos os mesmos procedimentos já descritos anteriormente para o seqüenciamento do gene TWIST. No caso do MSX2 foram feitos tanto seqüenciamentos com o *primer sense* como com o *antisense*.

4. *RESULTADOS*

4.1 Estudo Citogenético

Em uma situação (caso isolado 3), o quadro clínico evidenciava a Síndrome de Saethre-Chotzen e foi detectada alteração cromossômica envolvendo a região do gene TWIST, 46, XX add7(p21), correspondente, a essa condição clínica.

Nos outros casos a análise citogenética comum não determinou a presença de nenhuma outra alteração.

4.2 Investigação Molecular

4.2.1 Gene TWIST

Amplificação do Exon 1

A amplificação do fragmento **TW1** e **TW2** estão demonstradas nas figuras abaixo (Figuras 16 e 17).

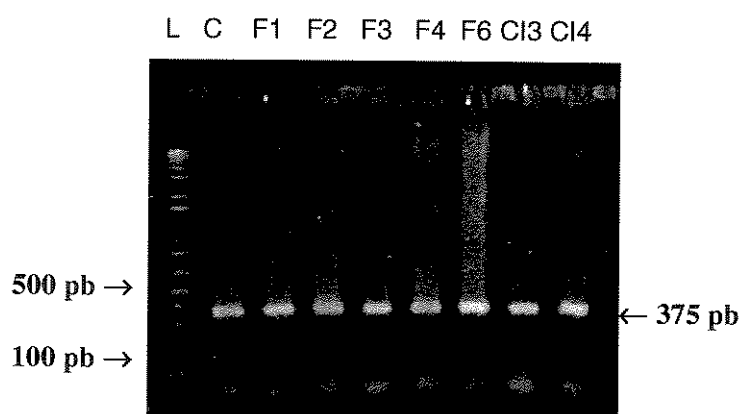


Figura 16 Fragmento TW 1: Amplificação dos indivíduos F1, F2, F3, F4, F6, CI3, CI4 e um controle negativo (C). Ladder de 1k bp (L).

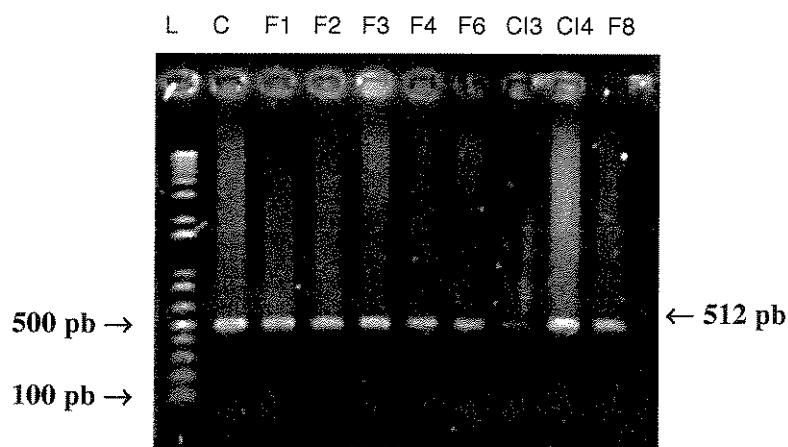


Figura 17 Fragmento **TW2**: Amplificação dos indivíduos F1, F2, F3, F4, F6, CI3, CI4, F8 e um controle negativo (C). Ladder de 1k bp (L).

Seqüenciamento Automático

O seqüenciamento do fragmento **TW1** direto do produto de PCR foi realizado em todos os probandos das famílias e casos isolados com sinais sugestivos da Síndrome de Saethre-Chotzen, mas isso somente foi possível utilizando-se o *primer sense*. Nenhuma mutação foi encontrada nesse fragmento.

O seqüenciamento do fragmento **TW2** direto do produto de PCR não apresentou bons resultados, tornando difícil a leitura e interpretação, sendo necessária a utilização da técnica de clonagem do fragmento antes do seqüenciamento.

No caso isolado 3, além da translocação envolvendo a região do gene TWIST, também foi notada a presença de uma mutação pontual, tratando-se da troca de uma isoleucina por uma valina no aminoácido 156, mutação Ile156Val (Figura 18).

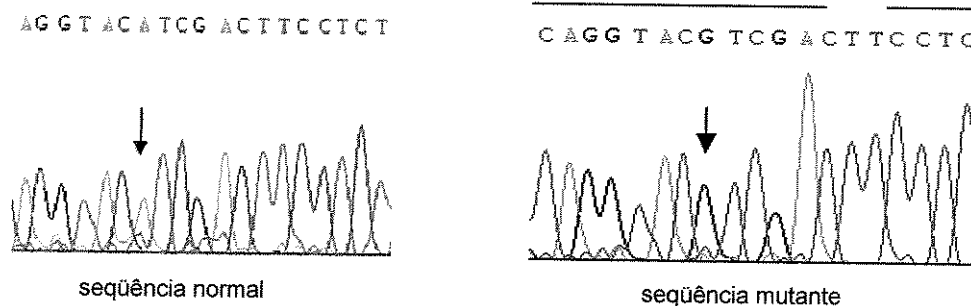


Figura 18 Troca ATC → GTC no caso isolado 3: mutação Ile156Val.

No caso isolado 4, verificou-se uma troca no fragmento TW2, tratando-se da inversão T → A no aminoácido 187, mutação Phe187Tyr (Figura 19).

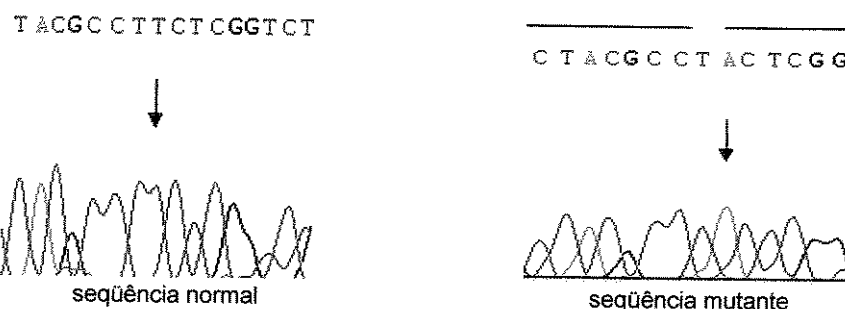


Figura 19 Troca TTC → TAC no caso isolado 4: mutação Phe187Tyr.

No caso isolado 6, também se encontrou uma mutação pontual no fragmento TW2, tratando-se da troca GAC → AAC no aminoácido 157, caracterizando a substituição de um ácido aspartâmico por uma asparagina, mutação Asp157Asn (Figura 20).

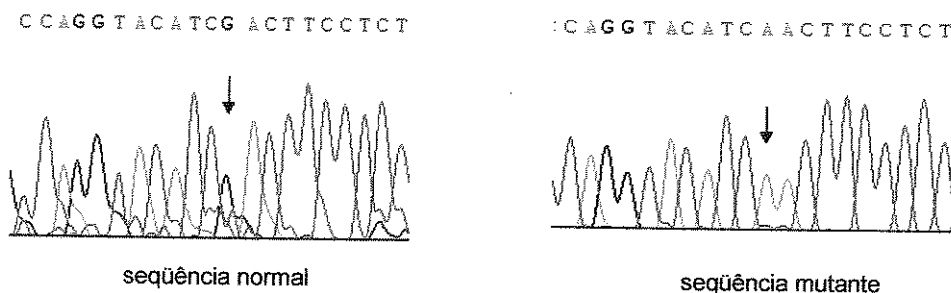


Figura 20 Troca GAC → AAC no caso isolado 6: mutação Asp157Asn.

4.2.2 Gene FGFR1

Mesmo que a mutação P252R só ocorra nos casos de Síndrome Pfeiffer, optou-se por procurá-la em todos os casos. A Figura 21 mostra a amplificação do exon 5 do FGFR1.

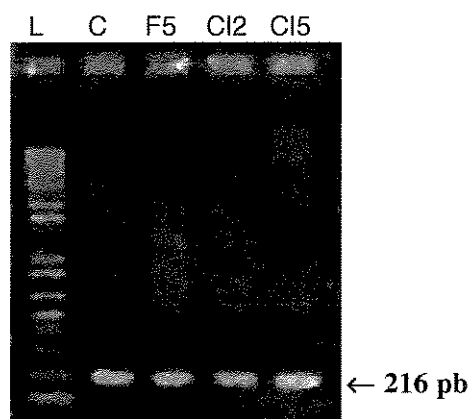


Figura 21 Exon 5 do FGFR1: Amplificação dos indivíduos F5, CI2, CI5 e um controle negativo (C). Ladder de 1k bp (L).

Digestão com a enzima *Mnl* I

A mutação P252R no gene FGFR1 provoca a perda de um sítio de corte para a enzima de restrição *Mnl* I. Dessa forma para se procurar essa mutação realizou-se a digestão do exon 5 dos indivíduos, com a enzima *Mnl* I, que tem como propriedade cortar a sequência de nucleotídeos CCTC(N)₇. Assim, em gel de agarose pode-se distinguir o alelo mutante do selvagem, pois o primeiro apresenta um fragmento de 146pb (a mutação faz com que ocorra a perda do sítio de corte) e no segundo apenas se visualiza o fragmento de 108pb, após a digestão.

A análise dos produtos de *PCR*, após a reação com a *Mnl* I, não evidenciou a formação de novos fragmentos em nenhum caso, nem naqueles com diagnóstico de Pfeiffer.

A Figura 22 mostra a digestão de alguns casos, inclusive os três de Pfeiffer.

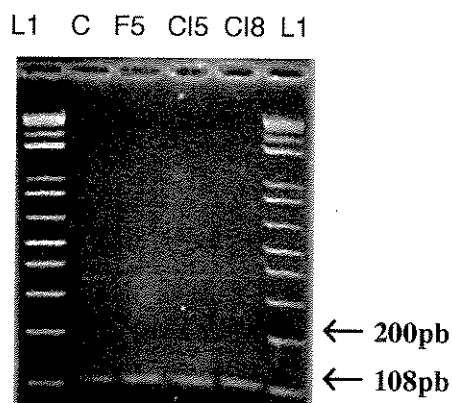


Figura 22 Exon 5 do FGFR1: Não houve a formação de novos fragmentos nos casos de Pfeiffer (F5, CI5 e CI8) e nem em outros casos. Controle negativo (C) .Ladder de 1k bp (L1).

4.2.3 Gene FGFR2

Amplificação do exon 8 (IIIa) e exon 10 (IIIc)

A amplificação de ambos os exons está demonstrada na figura 23.

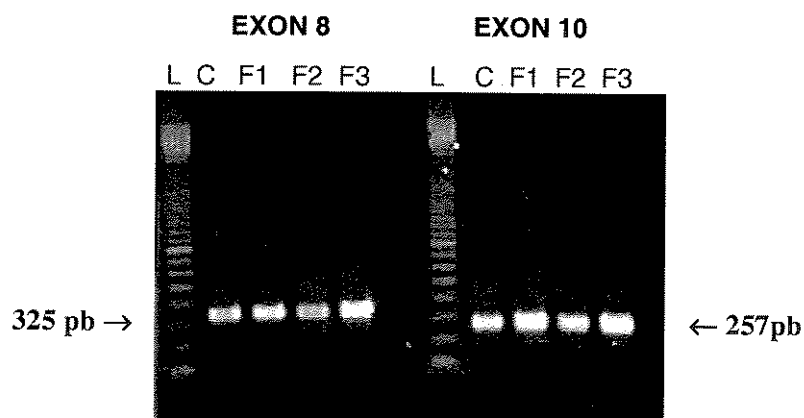


Figura 23 Exon 8 E 10 do FGFR2: Amplificação dos indivíduos F1, F2, F3 e um controle negativo (C) .Ladder de 1k bp (L).

Seqüenciamento Direto

Os exons 8 e 10 do FGFR2 foram completamente seqüenciados nos propósitos das famílias e nos casos isolados.

EXON 8 (IIIa)

A leitura do seqüenciamento direto do exon 8 da família 1, a maior família em estudo, demonstrou no propósito, uma banda tanto em A como em C, sugerindo uma troca nucleotídica A → C, na posição 866. Essa transversão causaria troca do aminoácido no códon 289 de Glutamina (Q) para Prolina (P). O controle normal não apresentou esta alteração (Figura 24).

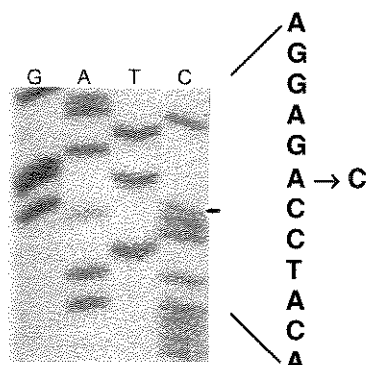


Figura 24 Troca CAG → CCG no propósito da família 1: mutação Gln289Pro.

PCR alelo-específico

Para confirmação da mutação encontrada no propósito da família 1 foi utilizada a técnica de PCR alelo-específico, ou seja, foram desenhados *primers* tanto mutante, para a seqüência que poderia ter uma troca, como normal, para anelar na seqüência original. Na tabela abaixo os *primers* utilizados.

Tabela 13 *Primers* alelo-específicos para a mutação Q289P.

	Primers 5' → 3'	Tm (°C)
FGFR2	289Q – TTC CAC GTG CTT GAT CCA CT	62
	289P – TCC ACG TGC TTG ATC CAC G	

A reação teve os mesmos parâmetros da reação de PCR normal (Figura 25).

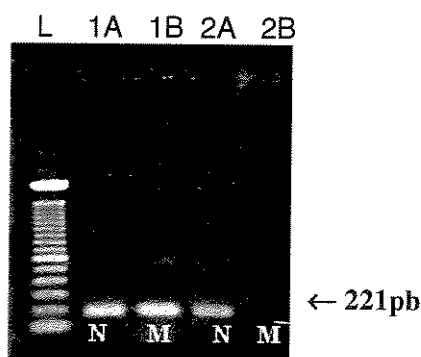


Figura 25 Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Confirmação da mutação Q289P. Coluna L, ladder 1kpb; colunas 1A e 1B membro afetado da família (propósito); colunas 2Ae 2B controle negativo.

Deste modo, confirmou-se que o propósito realmente possuía a mutação, mas não se conseguiu chegar a um resultado conclusivo acerca do restante da família, foi necessária a utilização de outra técnica para investigar a mutação no restante.

Digestão com a enzima de restrição *BsaJ* I

Uma análise de sequência utilizando o programa Gene Runner 3.0 (Hastings Software Inc.), revelou que a troca A→C criaria um sítio de corte com a enzima de restrição *BsaJ* I. Dessa forma, para se convalidar a variação observada realizou-se a digestão do exon 8 dos componentes da família 1 com a enzima *BsaJ* I (New Englans Biolabs), que tem como propriedade cortar a sequência de nucleotídeos C/ CNNGG, onde N pode ser qualquer base. Assim, seriam formados 3 fragmentos contendo 157pb, 168pb e 325pb a partir da digestão do fragmento mutante.

Os componentes para a reação da enzima de restrição *BsaJ* I foram os seguintes:

- ▶ 9 µl de PCR
- ▶ 0,6 µl enzima *BsaJ* I
- ▶ 3 µl tampão da *BsaJ* I
- ▶ 17,4 µl de H₂O

A análise do produto de PCR após a reação com a enzima *Bsa*I evidenciou realmente a formação de novos fragmentos no propósito da família e em sua mãe apenas. No restante da família não foi evidenciada a mesma mutação (Figura 26).

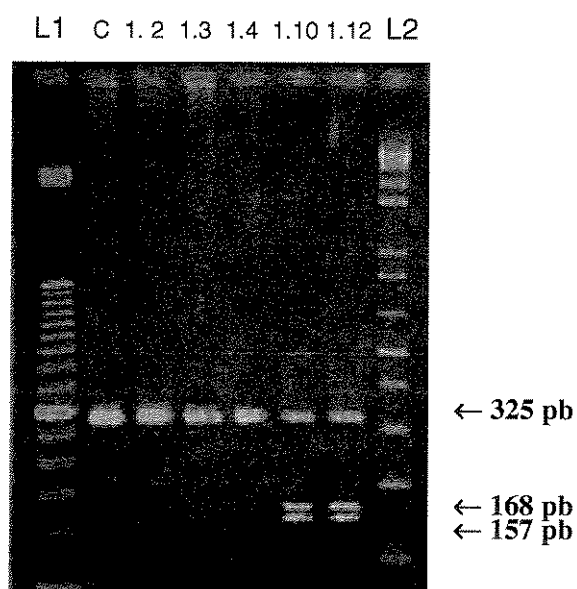


Figura 26 Exon 8 do FGFR2: Formação de novos fragmentos no propósito (1.10) e sua mãe (1.12) . Controle negativo (C) .Ladder de 1k bp (L1) e ladder de 100pb (L2).

Em algumas famílias que participaram da pesquisa mais tardiamente foi utilizado o seqüenciamento automático na busca de mutações neste gene também, seguindo o mesmo protocolo do gene TWIST.

No seqüenciamento automático do exon 8 do caso isolado 7, encontrou-se a troca C → G em heterozigoze no aminoácido 252 (TCG → TGG), caracterizando a mutação Ser252Trp (Figura 27). Tanto a seqüência *sense* como a *antisense* possuíam a mesma troca, confirmando o resultado. Os pais do paciente não apresentam a mutação.

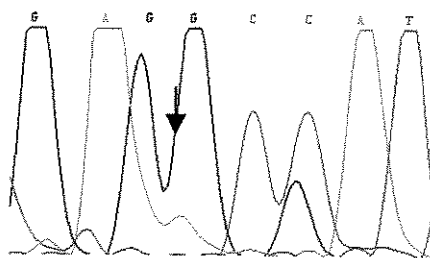


Figura 27 Troca TCG → TGG no caso isolado 7: mutação Ser252Trp.

No sequenciamento automático do exon 8 do caso isolado 8, foi encontrada a troca T → C em heterozigoze no aminoácido 267 (TCC → CCC), caracterizando a mutação Ser267Pro (Figura 28). Tanto a sequência *sense* como a *antisense* possuíam a mesma troca, confirmando o resultado. Os pais do paciente não foram testados.

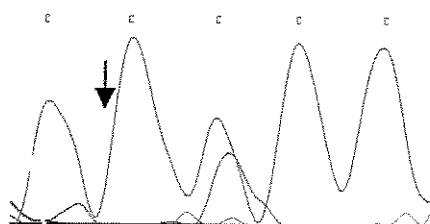


Figura 28 Troca TCC → CCC no caso isolado 8: mutação Ser267Pro.

No restante das famílias as leituras dos seqüenciamentos direto do exon 8 não demonstraram a presença de nenhuma alteração.

EXON 10 (IIIc)

No sequenciamento automático do exon 10 do propósito da família 5 encontrou-se a troca G → C em heterozigoze no aminoácido 351, caracterizando a mutação Ser351Cys (Figura 29). O sequenciamento manual já havia sido feito e foi utilizado para confirmar o resultado. Os pais não apresentam a mesma mutação, tratando então de uma mutação nova.

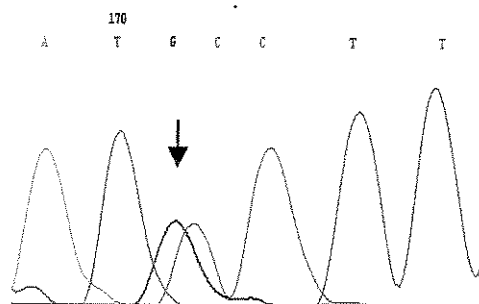


Figura 29 Troca TCC→TGC no propósito da família 5: mutação Ser351Cys.

No propósito da família 12 foi detectada a troca G → A no aminoácido 342, caracterizando a mutação Cys342Tyr (Figura 30). A troca foi confirmada pelo sequenciamento com o *primer antisense*. A mesma troca foi detectada em um dos irmãos e também na mãe do propósito.

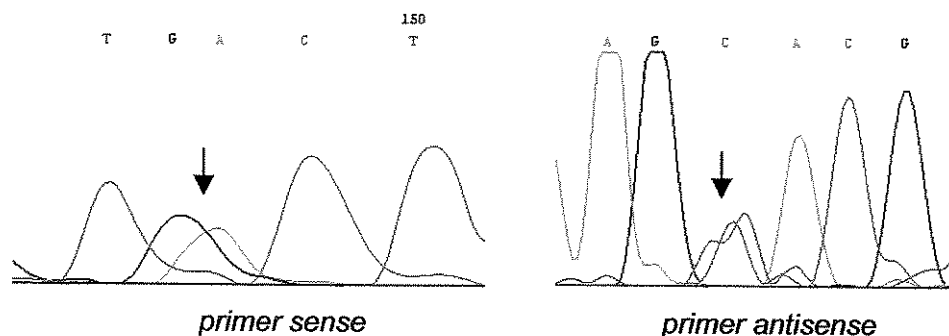


Figura 30 Troca TGC→TAG no propósito da família 12: mutação Cys342Tyr.

No restante das famílias as leituras dos sequenciamentos direto do exon 10 não demonstraram a presença de nenhuma alteração.

4.2.4 Gene FGFR3

Amplificação do exon 7

A amplificação do exon 7 do FGFR3 está demonstrada na figura 31.

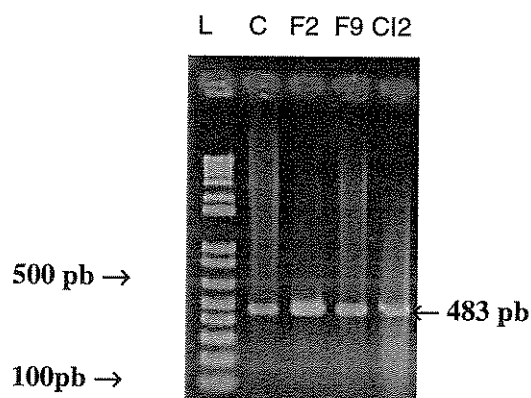


Figura 31 Exon 7 do FGFR3: Amplificação dos indivíduos F2, F9, CI2 e um controle negativo (C). Ladder de 1k bp (L).

Digestão com a enzima *Nci* I

A mutação P250R no gene FGFR3 cria um sítio de corte para a enzima de restrição *Nci* I. Dessa forma para se procurar essa mutação realizou-se a digestão do exon 7 dos indivíduos, com a enzima *Nci* I, que tem como propriedade cortar a sequência de nucleotídeos CC/SGG, onde S é G ou C. Assim, seriam formados 4 fragmentos contendo 123pb, 151pb, 209pb e 360pb a partir da digestão do fragmento.

A análise dos produtos de *PCR*, após a reação com a *Nci* I, evidenciou a formação de novos fragmentos apenas na família 9.

O restante da família também foi testado e confirmou-se que o propósito e seu pai apresentavam a mutação P250R no gene FGFR3 (Figura 32).

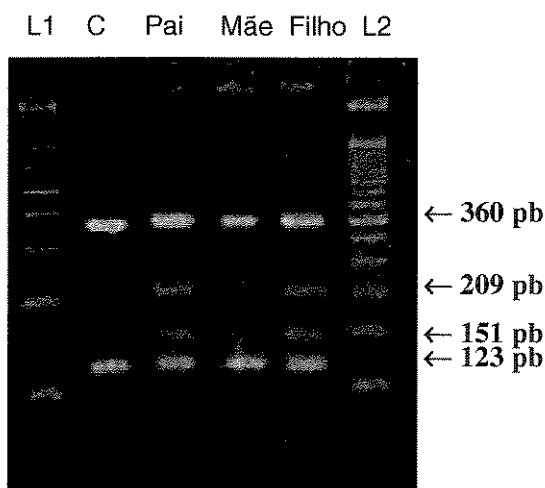


Figura 32 Exon 7 do FGFR3: Formação de novos fragmentos no pai e propósito da família 9. Controle negativo (C) .Ladder de 1k bp (L1) e ladder de 50pb (L2).

4.2.5 Gene MSX2

Amplificação do fragmento do exon 2

A amplificação do fragmento está demonstrada na figura 33.

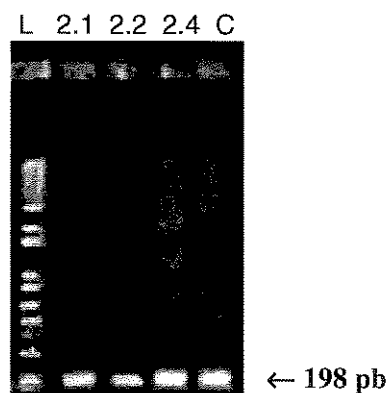


Figura 33 Exon 2 do MSX2: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Demonstrativo de amplificação dos indivíduos com sinais clínicos da família 2 : 2.1, 2.2, 2.4 e um controle negativo (C) .Ladder de 1k bp (L).

Seqüenciamento Direto

O fragmento do exon 2 do propósito das famílias 2 e 13, anteriormente amplificado, foi completamente seqüenciado, utilizando-se tanto o *primer sense* como o *antisense*, na busca das mutações anteriormente descritas.

As leituras dos seqüenciamentos não demonstraram a presença de nenhuma alteração (Figura 34).

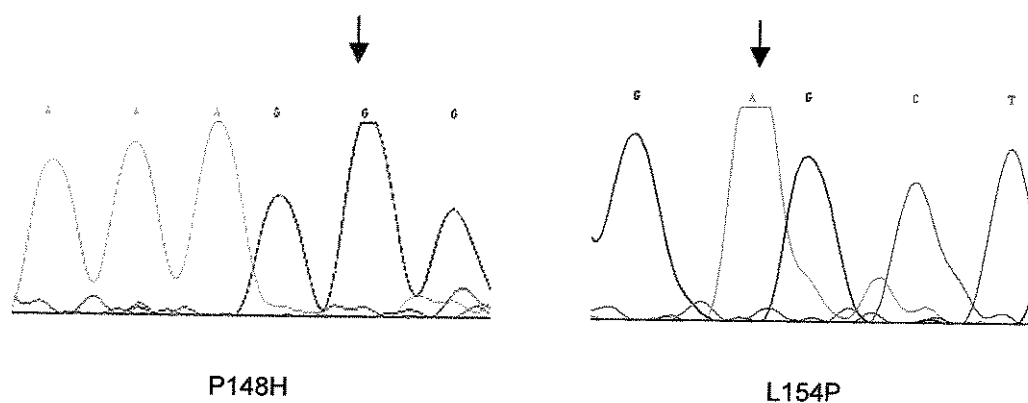


Figura 34 Seqüenciamento do propósito da família 2. A figura mostra que não há a troca C → A, que caracteriza a mutação Pro148His (Síndrome Boston) e não há a troca T → C, que caracteriza a mutação Leu154Pro (Forame Parietal).

A tabela 14 resume os resultados encontrados.

Tabela 14 Resumo dos resultados

Casuística	Hipótese diagnóstica	TWIST	FGFR1	FGFR2	FGFR3	MSX2
Família 1	SSC	-	NA	Gln289Pro	-	NA
Família 2	SSC	-	-	-	-	-
Família 3	SSC	-	-	-	-	NA
Família 4	SSC	-	-	-	-	NA
Família 5	S.Pfeiffer tipo III	NA	-	Ser351Cys	-	NA
Família 6	SSC	I	NA	-	-	NA
Família 7	Sem classificação	NA	-	-	-	NA
Família 8	SSC	I	-	-	-	NA
Família 9	SSC	NA	NA	-	Pro250Arg	NA
Família 10	Sem classificação	NA	-	-	-	NA
Família 11	Sem classificação	NA	-	-	-	NA
Família 12	S.Crouzon	NA	NA	Cys342Tyr	-	NA
Família 13	Forame parietal	NA	-	NA	NA	-
Caso isolado 1	Sem classificação	NA	-	-	-	NA
Caso isolado 2	Coronal isolada	NA	-	-	-	NA
Caso isolado 3	SSC	Ile156Val	-	-	-	NA
Caso isolado 4	SSC	Phe187Tyr	-	-	-	NA
Caso isolado 5	S.Pfeiffer tipo II	NA	-	-	-	NA
Caso isolado 6	SSC	Asp157Asn	-	-	-	NA
Caso isolado 7	S. Apert	NA	-	Ser252Trp	-	NA
Caso isolado 8	S. Pfeiffer tipo I	NA	-	Ser267Pro	NA	NA

(-) resultado negativo, nenhuma mutação encontrada

NA não analisado

I inconclusivo

5. *DISCUSSÃO*

5. Discussão

Neste estudo, foram verificadas mutações nos principais genes relacionados a craniossinostoses, em uma casuística composta por 13 famílias e 8 casos isolados, sendo que, do total, 15 eram portadores de craniossinostoses síndrômicas classicamente reconhecidas, 1 indivíduo com craniossinostose isolada e 5 com quadros de anomalias múltiplas envolvendo contorno de crânio significativamente anormal, que sugeria interferência no fechamento das suturas cranianas.

Inicialmente, a estratégia utilizada foi baseada no algoritmo proposto por CHUN et al (2003). De acordo com esses autores, o algoritmo propiciaria o diagnóstico molecular de pacientes com craniossinostose de maneira mais eficiente e de custo menor nas situações mais comuns, o que seria bastante interessante para o tipo de serviço no qual a casuística foi coletada.

Entretanto, foram necessárias algumas adaptações, principalmente nos casos de Síndrome de Saethre-Chotzen. De acordo com a proposta de CHUN et al.(2003), nesses casos dever-se-iam investigar os genes TWIST e FGFR3. Tendo em vista que não foram detectadas mutações nessas regiões em sete dos casos estudados nesta casuística, outros pontos de mutações frequentes foram verificados, baseando-se em revisão de literatura (KAN et al., 2002). Portanto, tendo em vista a complexidade das vias de desenvolvimento craniofaciais e dos membros, embora este estudo tenha sido baseado no algoritmo supracitado, não se perderam de vista outros dados relevantes da literatura, o que permitiu buscar novas mutações, em diferentes genes e contribuir para o conhecimento deste assunto tão complexo. Para melhor entendimento, essa discussão foi dividida em tópicos, de acordo com o gene estudado.

Gene TWIST

A investigação do gene TWIST é dificultada pelo fato de sua composição ser rica em CGs. Estes formam estruturas secundárias de DNA que atrapalham o anelamento dos *primers* e causam muitos erros de incorporação (LOEWEN et al., 1995). Possivelmente por essa razão, os estudos deste gene são mais restritos, em

comparação com outros genes relacionados às craniossinostoses, nos quais muitas mutações diferentes já foram descritas e um banco de dados grande está disponível.

Neste estudo, após sanadas as dificuldades técnicas, foram encontradas algumas alterações no gene TWIST e também muitos polimorfismos.

Houve muita discrepância acerca do número de glicinas (Gly) nos indivíduos estudados, o que é semelhante aos resultados de estudos anteriores. ELANKO e colaboradores (2001) detectaram que muitos pacientes apresentavam número divergente de (Gly)₅Ala(Gly)₅ na região rica em glicina. Os autores concluíram que esse número variável não pode ser a causa da Síndrome de Saethre-Chotzen e seriam pouco patogênicos, visto que muitos controles normais também apresentavam as mesmas seqüências.

No estudo citogenético do caso isolado 3 evidenciou-se uma translocação envolvendo a região do gene TWIST (46, XX add7(p21)). Estudos anteriores mostraram que esta poderia ser a causa da SSC desse paciente (ROSE et al., 1997; KREBS et al., 1997). Entretanto, além dessa translocação o paciente também apresentava uma mutação pontual no aminoácido 156 (Ile156Val). Esta já havia sido descrita anteriormente (SETO et al., 2001) e, deste modo, seria a causa mais provável do quadro clínico, visto que não existem elementos que comprovem que a translocação detectada poderia estar envolvida na disrupção do gene. Outras duas mutações novas que resultam em troca de aminoácidos foram encontradas, uma no caso isolado 4 (Phe187Tyr) e a outra no caso isolado 6 (Asp157Asn). Ambas são mutações *missense* e poderiam estar envolvidas em alterações de dimerização da proteína TWIST. Isto não permitiria a função correta, comprovando que mutações nesse gene geram haploinsuficiência (EL GHOUZZI et al., 2000). No caso da mutação Asp157Asn, muitas outras mutações nos aminoácidos vizinhos (156, 158) já haviam sido descritas (SETO et al., 2001; ELANKO et al., 2001).

Dos 10 casos de Síndrome de Saethre-Chotzen, em mais de 50% não foi possível estabelecer a etiologia. Para tanto, seriam necessárias outras técnicas, como estudo citogenético com FISH, para busca de outras aberrações cromossômicas, e Southern blot em busca de deleções. Segundo GRIPP et al. (2001), cerca de 28% dos casos de SSC seriam causados por deleções e inserções, mutações também muito

comuns nesse gene. Uma outra possibilidade para o resultado encontrado neste estudo seria a limitação das técnicas de biologia molecular, que mesmo tão avançadas, ultimamente, podem não esclarecer a etiologia dos casos. Ressalta-se, ainda, que outros estudos obtiveram, no máximo, 46% de diagnóstico (PAZNEKAS et al., 1998).

Gene FGFR1

Esta mutação foi descrita apenas em casos de Síndrome Pfeiffer e acredita-se que apenas 5% de todos os casos apresentem essa mutação, sendo que os outros 95% apresentariam mutações no gene FGFR2 (ROBIN et al., 1994; MUENKE et al., 1994). Portanto, apesar da presente casuística incluir 3 casos de Síndrome Pfeiffer, a não detecção de mutações nesta região pode ser considerada dentro do esperado para esta condição clínica.

Gene FGFR2

Embora tenham sido investigadas apenas as regiões mais prováveis de se encontrarem mutações neste gene, foram detectadas mutações em cinco casos.

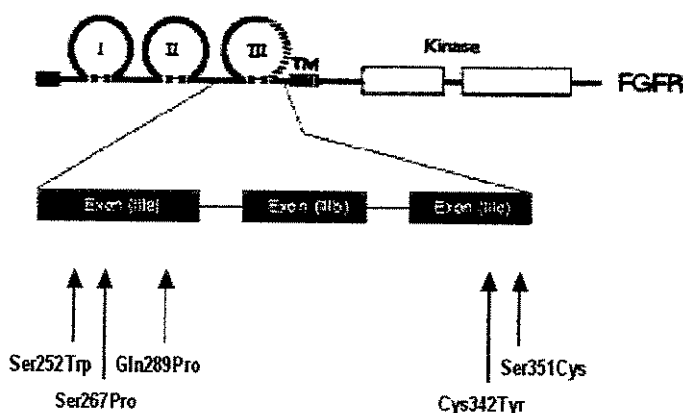


Figura 35 Localização das mutações encontradas no gene FGFR2

Neste estudo, detectou-se uma mutação nunca antes descrita na Síndrome de Saethre-Chotzen, a mutação Q289P no gene FGFR2, detectada na família 1.

Entretanto, esta mutação não estava presente em todos os membros afetados e para explicar isso algumas hipóteses podem ser formuladas: a primeira delas é a possibilidade de achados normais comuns à família não associados a SSC, terem superestimado o número de indivíduos afetados. Contra isso, temos a prima (indivíduo IV-5 do heredograma em anexo) por parte de mãe do probando, que é clinicamente bastante afetada e não apresentou a mutação. A segunda hipótese é a possibilidade da mutação Q289P ser um polimorfismo de baixa frequência, não relacionada a craniossinostose. Porém, essa mesma mutação já havia sido descrita em famílias afetadas pela Síndrome de Crouzon (SC) e Jackson-Weiss (GORRY et al, 1995; OLDRIDGE et al, 1995; MEYERS et al., 1996). Os principais sinais clínicos encontrados na SC são restritos à face. Na JW, observam-se háluces alargados e fusão óssea nos pés (WILKIE, 1997). A SSC tem algumas similaridades com ambas as condições, assim como com várias outras condições clínicas relacionadas. De fato, diferentes fenótipos decorrentes da mesma mutação não são um fenômeno raro nas craniossinostoses.

Outra possibilidade de explicação poderia ser que a proteína Q289P mutada agisse apenas como um modulador sobre o mecanismo de fechamento prematuro das suturas. Isso pode ser sustentado pelo fato de que nos estudos no qual foi descrita esta mutação em SC e SJW, outros pontos de mutação não foram testados, somente os exons IIIa e IIIc do gene FGFR2.

A sobreposição de sinais clínicos e a presença de mutações nos genes TWIST, FGFR2 e FGFR3 são consistentes com a proposta desses genes estarem envolvidos na mesma via molecular, a qual modularia o desenvolvimento craniofacial e dos membros humanos (MUENKE e SCHELL, 1995; GOLLA et al., 1997; REARDON et al., 1997; PAZNEKAS et al., 1998; PASSOS-BUENO et al., 1999; RICE et al., 2000; EL GHOUZZI et al., 2001; CHUN et al., 2002).

Existem escassos relatos de mutações no gene FGFR2 que levariam a SSC. Por esse motivo, esta região não foi referida por CHUN et al (2003) para investigação nessa condição clínica. Tendo em vista o resultado encontrado neste estudo, propõe-se que, nos casos de SSC nos quais mutações nos genes mais comuns não sejam encontradas, sejam pesquisados os éxon 8 e 10 do gene FGFR2.

Alguns outros exemplos, envolvendo duas condições clínicas com a mesma mutação no FGFR2, podem ser mencionados, como a Cys342Tyr, descrita tanto nas síndromes de Crouzon como em Pfeiffer e que foi encontrada no probando da família 12, que apresentava sinais compatíveis com a Síndrome de Crouzon (REARDON et al., 1994; RUTLAND et al., 1995); Cys342Arg, que pode ser detectada em Crouzon, Pfeiffer e Jackson-Weiss (REARDON et al., 1994; RUTLAND et al., 1995; PARK et al., 1995) ou Cys342Ser e Ala344Gly, descrita em Crouzon e Jackson-Weiss (REARDON et al., 1994; TARTAGLIA et al., 1997; JABS et al., 1994).

As outras quatro mutações encontradas no gene FGFR2, no presente estudo, já haviam sido anteriormente descritas.

A mutação Ser351Cys foi detectada em um dos tipos mais graves de Pfeiffer, o tipo III (GRIPP et al., 1998), e o probando da família 5 realmente apresenta características peculiares a essa condição clínica. Tendo em vista que os pais não apresentavam sinais clínicos, nem a mesma troca, trata-se de uma mutação nova.

A mutação Ser252Trp encontrada no caso isolado 7 também confirma o diagnóstico, pois essa mutação é a mais comumente encontrada nos casos de Apert (WILKIE et al., 1995) e também se tratava de uma mutação nova.

A mutação Cys342Tyr encontrada no probando da família 12, no seu irmão e sua mãe, também confirmam o diagnóstico de Síndrome de Crouzon, tratando-se de um caso familiar.

Também a mutação Ser267Pro encontrada no caso isolado 8 confirma o diagnóstico, pois já havia sido descrita em casos de Síndrome Pfeiffer (CORNEJO-ROLDAN et al., 1999). Essa mesma mutação também já havia sido descrita em casos de câncer gástrico (JANG et al., 2001). Isso evidencia que os FGFRs além de atuarem no fechamento das suturas também estão envolvidos em outros processos celulares. Além disso, permite que para esse indivíduo sejam tomados cuidados de saúde preventivos em relação ao câncer.

Nos outros casos em que não foram detectadas alterações nesse gene, ainda existe a possibilidade de que elas existam em exons não pesquisados, visto que, segundo KAN et al. (2002), outros exons também podem ser acometidos, embora numa frequência muito menor. Esta investigação, entretanto, foge ao escopo deste estudo.

Não se pode descartar a hipótese de que em alguns indivíduos a craniossinostose possa ser decorrente de mutações em regiões de intron que, dependendo da amplitude da PCR, não são amplificadas e escapam a qualquer análise por seqüenciamento. Apesar dessas mutações estarem localizadas em regiões não traduzidas do gene, que não fazem parte da proteína madura, podem comprometer a expressão correta do gene ou o processamento do pré-RNA mensageiro.

Gene FGFR3

A mutação P250R do gene FGFR3 deveria ser testada em quase todas as entidades clínicas nas quais mutações no principal gene responsável pelo fenótipo não foram encontradas (CHUN et al., 2003). Isso se deve a estudos anteriores nas quais muitos pesquisadores encontraram esta mutação nos mais diversos fenótipos, inclusive naqueles sem nenhuma classificação (BELLUS et al., 1996).

Portanto, essa mutação foi investigada em todas as famílias desta casuística, com especial atenção àquelas com sinais clínicos sugestivos de Saethre-Chotzen, já que, comprovadamente, esta mutação é a segunda maior causadora desta síndrome, depois das mutações no gene TWIST (PAZNEKAS et al., 1998).

A casuística não possuía nenhuma família com diagnóstico da Síndrome de Muenke. Essa síndrome foi definida por Muenke e colaboradores, em 1997, por meio de um estudo com muitas famílias com variabilidade inter e intra-familiar, na qual os principais sinais clínicos incluíam: craniossinostose bilateral ou unilateral e anomalias específicas ósseas das mão e pés em alguns indivíduos afetados. Em todas as famílias, a mutação responsável pelo fenótipo era a P250R no FGFR3.

Outras mutações nesse gene também já foram descritas associadas a displasias esqueléticas, especificamente acondroplasia, hipocondroplasia e displasia tanatofórica, acompanhadas ou não de malformações no crânio (REARDON, 1996). Portanto, diferentes mutações no FGFR3 devem ter diferentes efeitos na intensidade e/ou especificidade da transdução de sinais através de cada uma das vias de ação desse gene. A importância de sua ação no desenvolvimento de cada tecido também é diferente. Por isso, o efeito do gene pode ser visto em mais de um tipo de entidade clínica.

Apesar de todos esses fatos, de todas as famílias e casos isolados aqui estudados, apenas uma com diagnóstico clínico de SSC apresentava a mutação P250R no gene FGFR3. Isso poderia ser justificado pelo tamanho da casuística, que representa os casos que buscaram diagnóstico e aconselhamento genético neste serviço, em contraponto com os estudos populacionais realizados por alguns autores (REARDON et al., 1997; PAZNEKAS et al., 1998; EL GHOUZZI et al., 1999).

Gene MSX2

Nesse gene, até o momento, a única mutação descrita é a Pro148His. Essa determina uma síndrome característica, a Síndrome Boston. Apesar da presente casuística não possuir nenhuma família ou caso isolado dessa síndrome, ou mesmo algum quadro parecido com ela, essa mutação foi investigada, com o objetivo de verificar sua presença em algum outro quadro, especialmente aqueles sem diagnóstico.

Isso foi realizado, na tentativa de esclarecimento molecular em uma família bastante incomum (família 2), na qual um mesmo indivíduo apresentava cranioossinostose e forame parietal. Estes dois sinais, de acordo com a literatura, seriam causados por dois tipos de mutações antagônicas: a primeira por ganho de função e a segunda por perda.

O forame parietal pode ser causado por mutações no MSX2 (WUYTS et al., 2000; WILKIE et al., 2000) e também por mutações em um outro gene, o ALX4 (MAVROGIANNIS et al., 2001; WUYTS et al., 2000). Nessa família e na outra apenas com presença de forame parietal (família 13), buscou-se a mutação mais comum que causaria o forame (Leu154Pro), além de buscar a mutação Pro148His, determinante da Síndrome Boston. Uma proposta para o prosseguimento do estudo nessas famílias seria a investigação de outros genes incomuns e também o ALX4.

A similaridade do fenótipo causado por mutações no MSX2 e ALX4 sugerem uma ligação funcional entre esses dois fatores de transcrição. Contudo, não está claro se esta atuação seria hierarquicamente com o TWIST e os FGFRs, ou mesmo se ainda age em uma outra via independente (WILKIE et al., 2001).

Diagnóstico, aconselhamento genético e situações clínicas sem diagnóstico clínico e molecular

A maioria das craniossinostoses apresenta transmissão autossômica dominante e expressividade variável, com portadores, muitas vezes, possuindo sinais muito brandos. Essa grande variabilidade clínica pode dificultar o diagnóstico, em alguns casos. De fato, COHEN (1999), num artigo ilustrativo sobre esse assunto, discute a possível diferença da interpretação clínica ao se fazer um diagnóstico, devido à sobreposição de sinais nas diversas condições.

Devido a esse padrão de herança comum, à grande probabilidade de transmissão do alelo mutante e, principalmente, à grande dificuldade de se determinar os indivíduos realmente afetados nos casos brandos, o diagnóstico molecular pode ser importante em algumas situações clínicas.

Depois do diagnóstico clínico, complementado por estudo molecular, o correto aconselhamento genético para os membros da família interessados pode ser favorecido. O aconselhamento é o processo de fornecer aos indivíduos informações sobre a natureza, padrões de herança e implicações de desordens genéticas, para ajudá-los nas suas decisões tanto médicas como também pessoais.

Portanto, além do interesse científico deste trabalho, ele resultou em benefício direto de nove famílias, que puderam receber orientação mais adequadamente e, desse modo, planejar suas vidas reprodutivas.

Por outro lado, este trabalho não permitiu o esclarecimento diagnóstico de quadros de anomalias múltiplas com sinais evidentes de alteração de contorno craniano, sem craniossinostoses. Isso pode ter ocorrido por diferentes motivos: um deles seria o de que essas condições clínicas poderiam ser específicas, não relacionadas às regiões gênicas estudadas. Uma outra possibilidade seria de que elas poderiam estar presentes em outras regiões dos genes estudados, nas quais a detecção de mutações tem sido menos freqüentes. Por outro lado, o contorno craniano anormal, sem comprometimento clínico de craniossinostose, poderia ser decorrente de desbalanço de outros genes envolvidos na regulação da via de fechamento das suturas

(Opperman, 2000), ou, ainda, as malformações poderiam ser decorrentes de causas ambientais não identificadas durante a avaliação clínica.

Deste modo, objetivando futuro esclarecimento diagnóstico desses casos, seria mais adequado o seguimento longitudinal e o registro fotográfico evolutivo, para que estudos moleculares futuros possam ser realizados, de acordo com novas descobertas científicas na área.

Para melhorar o diagnóstico molecular das craniossinostoses síndrômicas, CHUN e colaboradores propuseram o algoritmo utilizado neste estudo. Após essa pesquisa, propõe-se que sejam incluídas algumas outras vias nesse algoritmo, para torná-lo ainda mais completo e eficaz. As alterações encontram-se na figura abaixo (Figura 36).

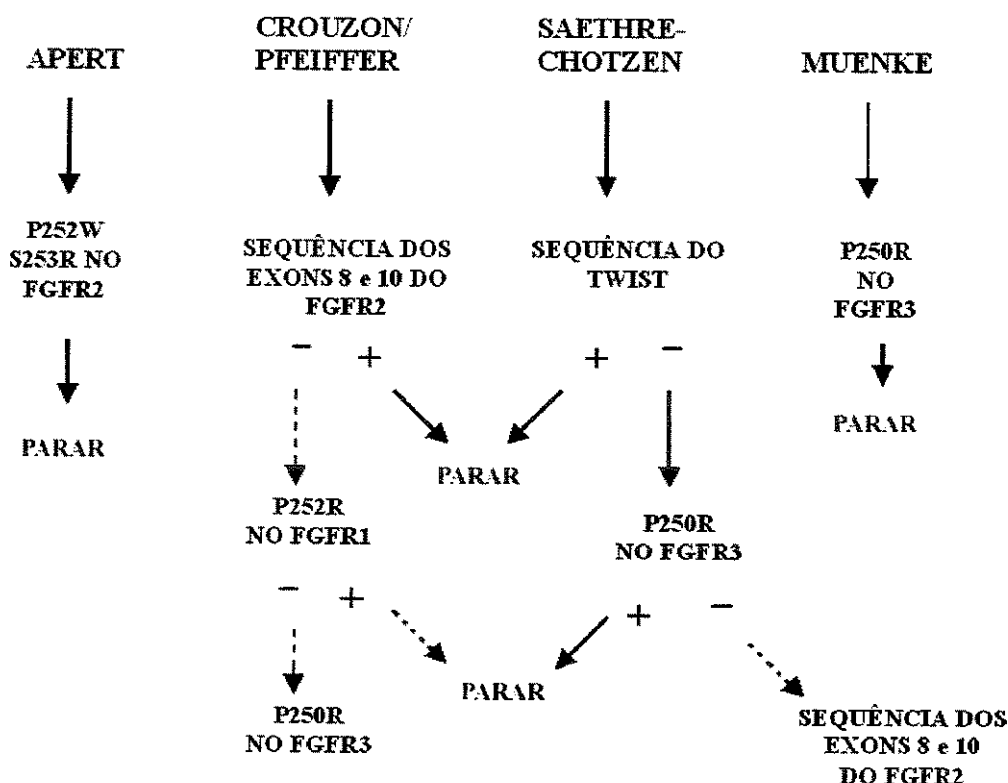


Figura 36 Nova proposta para diagnóstico das craniossinostoses síndrômicas: flechas contínuas proposta de CHUN e colaboradores; flechas descontínuas inclusões.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

Em uma casuística composta por 13 famílias e 8 casos isolados, foram detectadas mutações em regiões prováveis de mutação em 8 indivíduos, sendo que 5 foram nos exons 8 e 10 do FGFR2, 3 no exon 1 do TWIST e um caso apresentava a mutação Pro250Arg no gene FGFR3.

Dentre os quadros de craniossinostoses classicamente reconhecidos, o maior número de casos apresentaram suspeita de Síndrome de Saethre-Chotzen (10), seguido dos casos de Síndrome Pfeiffer (3).

Os achados moleculares na SSC predominaram no gene TWIST (3/10) compatível com a literatura. Mas muitos casos ainda permaneceram com a etiologia não esclarecida.

Os achados moleculares nas síndromes Pfeiffer, Apert e Crouzon localizavam-se nos exons 8 e 10 do gene FGFR2, também foram compatíveis com a literatura.

Detectou-se uma mutação não descrita na SSC no gene FGFR2, a mutação Q289P.

Nos indivíduos com forame parietal, não foram detectadas as mutações P148H (Síndrome Boston), nem a mutação L154P (Forame parietal). Portanto, outras regiões gênicas poderão ser investigadas no futuro.

Nos casos de anomalias congênitas múltiplas com alteração de contorno craniano, a metodologia utilizada não conseguiu esclarecer a etiologia. Estudos futuros e o seguimento clínico poderão colaborar para o esclarecimento destes diagnósticos.

Nesse estudo concluiu-se que, numa casuística pequena, o algoritmo de CHUN e colaboradores é principalmente útil nos casos em que o quadro é bem característico, como Pfeiffer, Apert e Crouzon.

Para que o algoritmo seja ainda mais completo, propõe-se que nos casos de SSC seja investigado também o gene FGFR2 e nos casos de Pfeiffer inclua-se a busca pela mutação P252R no FGFR1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASE JM: **Diagnostic Dysmorphology**, Plenum Medical Book Company, NY and London.

ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA, J.R.G.; FARAH, S.B.; DE MELLO, M.P. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Braz J Med Biol Res**, 29: 1-13, 1996.

BELLUS, G.A.; HEFFERON, T.W.; ORTIZ DE LUNA, R.I.; HECHT, J.T.; HORTON, W.A.; MACHADO M. et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. **Am J Hum Genet**, 56: 368-373, 1995.

BELLUS, G.A.; GAUDENZ, K.; ZACKAI, E.H.; CLARKE, L.A.; SZABO, J.; FRANCOMANO, C.A. Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndrome. **Nature Genet**, 14: 174-176, 1996.

BOURGEOIS, P.; STOETZEL, C.; BOLCATO-BELLEMIN, A.L.; MATTEI, M.G.; PERRIN-SCHMITT, F. The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a b-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. **Mammalian Genome**, 7: 915-917, 1996.

BRUETON, L.A.; van HERWERDEN, L.; CHOTAI, K.A.; WINTER, R.M. The mapping of a gene for craniosynostosis: evidence for linkage of the Saethre-Chotzen syndrome to distal chromosome 7p. **J Med Genet**, 29: 681-685, 1992.

CHUN, K.; TEEBI, A.S.; JUNG, J.H.; KENNEDY, S.; LAFRAMBOISE, R.; MESCHINO, W.S. et al. Genetic analysis of patients with the Saethre-Chotzen phenotype. **Am J Med Genet**, 110: 136-143, 2002.

CHUN, K.; TEEBI, A.S.; AZIMI, C.; STEELE, L.; RAY, P.N. Screening of patients with craniosynostosis: molecular strategy. **Am J Med Genet**, 120A(4):470-473, 2003.

COHEN, M.M. JR. **Craniosynostosis: diagnosis, evaluation and management**, 59-73, 215-243, 467-471. 1st edition, Raven, New York, 1986.

COHEN, M.M. JR; KREIBORG, S. Visceral anomalies in the Apert syndrome. **Am J Med Genet**, 45:758-60, 1993.

COHEN, M.M. JR; MACLEAN R.E. Should syndromes be defined phenotypically or molecularly? Resolution of the dilemma. **Am J Med Genet**, 86:203-204, 1999.

CORNEJO-ROLDAN, L.R.; ROESSLER, E.; MUENKE, M. Analysis of the mutational spectrum of the FGFR2 gene in Pfeiffer syndrome. **Hum Genet**, 104(5):425-31, 1999.

DIONNE, C.A.; CRUMLEY, G.; BELLOT, F.; KAPLOW, J.M.; SEARFOSS, G.; RUTA, M. et al. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. **EMBO J**, 9: 2685-2692, 1990.

ELANKO, N.; SIBBRING, J.S.; METCALFE, K.A.; CLAYTON-SMITH, J.; DONNAI, D.; TEMPLE, I.K. et al. A survey of TWIST for mutations in craniosynostosis reveals a variable length polyglycine tract in asymptomatic individuals. **Hum Mutat**, 18(6):535-41, 2001.

EL GHOUZZI, V.; LE MERRER, M.; PERRIN-SCHMITT, F.; LAJEUNIE, E.; BENIT, P.; RENIER, D. et al. Mutations in TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. **Nature Genet**, 15: 42-46, 1997.

EL GHOUZZI, V.; LAJEUNIE, E.; LE MERRER, M.; CORMIER-DAIRE, V.; RENIER, D.; MUNICH, A. et al. Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of

the TWIST gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome. **Eur J Hum Genet**, 7(1):27-33, 1999.

EL GHOUZZI, V.; LEGEAI-MALLET, L.; ARESTA, S.; BENOIST, C.; MUNNICH, A.; DE GUNZBURG, J. et al. Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. **Hum Mol Genet**, 22;9(5):813-9, 2000.

EL GHOUZZI, V.; LEGEAI-MALLET, L.; BENOIST-LASSELIN, C.; LAJEUNIE, E.; RENIER, D.; MUNNICH, A. et al. Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. **FEBS**, 492: 112-118, 2001.

GAUDENZ, K.; ROESSLER, E.; VAINIKKA, S.; ALITALO, K.; MUENKE, M. Analysis of patients with craniosynostosis syndromes for a pro246Arg mutation of FGFR4. **Mol Genet Metab**, 64(1):76-79, 1998.

GOLLA, A.; LICHTNER, P.; VON GERNET, S.; WINTERPACHT, A.; FAIRLEY, J.; MURKEN, J. et al. Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation P250R in a large craniosynostosis family. **J Med Genet**, 34: 683-684, 1997.

GORRY, M.C.; PRESTON, R.A.; WHITE, G.J.; ZHANG, Y.; SINGHAL, V.K.; LOSKEN, H.W. et al. Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. **Hum Mol Genet**, 4: 1387-1390, 1995.

GRIPP, K.W.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; GAUDENZ, K.; WHITAKER, L.A.; BARTLETT, S.P.; GLAT P.M. et al. Identification of a genetic cause for isolated unilateral coronal synostosis: a unique mutation in the fibroblast growth factor receptor 3. **J. Pediat**, 132: 714-716, 1998.

GRIPP, K.W.; STOLLE, C.A.; CELLE, L.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; WHITAKER, L.A.; ZACKAI, E.H. TWIST gene mutation in a patient with radial aplasia and craniosynostosis: further evidence for heterogeneity of Baller-Gerold syndrome. **Am J Med Genet**, 82(2): 170-6, 1999.

GRIPP, K.W.; KASPARCOVA, V.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; BHATT, S.; BARLETT, S.P.; STORM, A.L. et al. A diagnostic approach to identifying submicroscopic 7p21 deletions in Saethre-Chotzen syndrome: fluorescent in situ hybridization and dosage-sensitive Southern blot analysis. **Genet Med**, 3: 102-108, 2001.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **J Mol Biol**, 166(4):557-80, 1983.

HOLLWAY, G.E.; SUTHERS, G.K.; BATTESE, K.M.; TURNER, A.M.; DAVID, D.J.; MULLEY, J.C. Deafness due to pro250-to-arg mutation of FGFR3. (Letter) **Lancet**, 351: 877-878, 1998.

HOUSSAINT, E.; BLANQUET, P.R.; CHAMPION-ARNAUD, P.; GESNEL, M.C.; TORRIGLIA, A.; COURTOIS, Y. et al. Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. **Proc. Nat. Acad. Sci**, 87: 8180-8184, 1990.

HOWARD, T.D.; PAZNEKAS, W.; GREEN, E.D.; CHIANG, L.C.; MA, N.; ORTIZ DE LUNA, R.I. et al. Mutations in TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. **Nat Genet**, 15: 36-41, 1997.

INGERSOLL, R.G.; PAZNEKAS, W.A.; TRAN, A.K.; SCOTT, A.F.; JIANG, G.; JABS, E.W. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. **Cytogenet Cell Genet**, 94(3-4):121-6, 2001.

- ISEKI, S.; WILKIE, A.O.; HEATH, J.K.; ISHIMARU, T.; ETO, K.; MORRIS-KAY, G.M. Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. **Development**, 124(17):3375-84, 1997.
- JABS, E.W.; LI, X.; SCOTT, A.F.; MEYERS, G.; CHEN, W.; ECCLES, M. et al. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. **Nature Genet**, 8: 275-279, 1994.
- JANG, J.H.; SHIN, K.H.; PARK, J.G. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. **Cancer Res**, 61(9):3541-3, 2001.
- JOHNSON, D.; HORSLEY, S.W.; MOLONEY, D.M.; OLDRIDGE, M.; TWIGG, S.R.; WALSH, S. et al.: A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. **Am J Hum Genet**, 63(5): 1282-1293, 1998.
- KAN, S.; ELANKO, N.; JOHNSON, D.; CORNEJO-ROLDAN, L.; COOK, J.; REICH, E.W. et al. Genomic Screening of Fibroblast Growth-factor Receptor 2 Reveals a Wide Spectrum of Mutation in Patients with Syndromic Craniosynostosis. **Am J Hum Genet**, 70: 472-486, 2002.
- KEEGAN, K.; JOHNSON, D.E.; WILLIAMS, L.T.; HAYMAN, M.J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. **Proc Nat Acad Sci**, 88: 1095-1099, 1991.
- KIM, H.J.; RICE, D.P.; KETTUNEN, P.J.; THESLEFF, I. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. **Development**, 125(7):1241-51, 1998.

KREBS, I.; WEIS, I.; HUDLER, M.; ROMMENS, J.M.; ROTH, H.; SCHERER, S.W. et al. Translocation breakpoint maps 5kb 3' from TWIST in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome. **Hum Mol Genet**, 6: 1079-1086, 1997.

KRESS, W.; PETERSEN, B.; COLLMANN, H.; GRIMM, T. An unusual FGFR1 mutation (fibroblast growth factor receptor 1 mutation) in a girl with non-syndromic trigonocephaly. **Cytogenet Cell Genet**, 91(1-4):138-40, 2000.

KUNZ, J.; HUDLER, M.; FRITZ, B. Identification of a frameshift mutation in the gene TWIST in a family affected with Robinow-Sorauf syndrome. **J Med Genet**, 36(8):650-2, 1999.

LAJEUNIE, E.; LE MERRER, M.; BONAÏTI-PELLIE, C.; MARCHAC, D.; RENIER, D. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. **Am J Med Genet**, 13;55(4):500-4.1995.

LAJEUNIE, E.; MA, H.W.; BONAVENTURE, J.; MUNNICH, A.; LE MERRER, M.; RENIER, D. FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. (Letter). **Nature Genet**, 9: 108, 1995.

LAJEUNIE, E.; LE MERRER, M.; BONAÏTI-PELLIE, C.; MARCHAC, D.; RENIER, D. Genetic study of scaphocephaly. **Am J Med Genet**, 29;62(3):282-5, 1996.

LAJEUNIE, E.; EL GHOUZZI, V.; LE MERRER, M.; MUNNICH, A.; BONAVENTURE, J.; RENIER, D. Sex related expressivity of the phenotype in coronal craniosynostosis caused by the recurrent P250R FGFR3 mutation. **J Med Genet**, 36(1):9-13, 1999.

LEE, P. L.; JOHNSON, D. E.; COUSENS, L. S.; FRIED, V. A.; WILLIAMS, L. T. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. **Science**, 245: 57-60, 1989.

- LEWANDA, A.F.; GREEN, E.D.; WEISSENBAUGH, J.; JERALD, H.; TAYLOR, E.; SUMMAR, M.L. et al. Evidence that the Saethre-Chotzen syndrome locus lies between D7S664 and D7S507, by genetic analysis and detection of a microdeletion in a patient. **Am J Hum Genet**, 55(6):1195-201, 1994.
- LI, X.; MA, L.; SNEAD, M.; HAWORTH, I.; SPARKES, R.; JACKSON, C. et al. A mutation in the homeodomain of the *MSX2* gene in a family affected with craniosynostosis, Boston type. (Abstract) **Am J Hum Genet**, 53 (suppl.): A213 only, 1993.
- LOEWEN, P.C. & SWITALA, J. Template secondary structure can increase the error frequency of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. **Gene**, 164(1): 59-63, 1995.
- MA, L.; GOLDEN, S.; WU, L.; MAXSON, R. The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the pro148-to-his mutation in the N-terminal arm of the *MSX2* homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. **Hum Molec Genet**, 5: 1915-1920, 1996.
- MACIAS, D.; GANAN, Y.; SAMPATH, T.K.; PIEDRA, M.E.; ROS, MA.; HURLE, J.M. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. **Development**, 124(6):1109-17, 1997.
- MATTEI, M.G.; MOREAU, A.; GESNEL, M.C.; HOUSSAINT, E.; BREATHNACH, R. Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26. **Hum Genet**, 87: 84-86, 1991.
- MAVROGIANNIS, L.A.; ANTONOPOULOU, I.; BAXOVA, A.; KUTILEK, S.; KIM, C.A.; SUGAYAMA, S.M. et al. Haploinsufficiency of the human homeobox gene *ALX4* causes skull ossification defects. **Nat Genet**, 27(1):17-18, 2001.

MERINO, R.; RODRIGUEZ-LEON, J.; MACIAS, D.; GAÑAN, Y.; ECONOMIDES, A.N.; HURLE, J.M. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. **Development**, 126: 5515-5522, 1999.

MEYERS, G.A.; ORLOW, S.J.; MUNRO, I.R.; PRZYLEPA, K.A.; JABS, E.W. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. **Nature Genet**, 11: 462-464, 1995.

MEYERS, G.A.; DAY, D.; GOLDBERG, R.; DAENTL, D.L.; PRZYLEPA, K.A.; ABRAMS, L.J. et al. FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. **Am J Hum Genet**, 58: 491-498, 1996.

MONTERO, J.A.; GANAN, Y.; MACIAS, D.; RODRIGUEZ-LEON, J.; SANZ-EZQUERRO, J.J.; MERINO, R. Et al. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. **Development**, 128(11):2075-84, 2001.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. p. 330-344. 5ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

MOST, D.; LEVINE, J.P.; CHANG, J.; SUNG, J.; MCCARTHY, J.G.; SCHENDEL, S.A.; LONGAKER, M.T. Studies in cranial suture biology: up-regulation of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor mRNA correlates with posterior frontal cranial suture fusion in the rat. **Plast Reconstr Surg**, 101(6):1431-40, 1998.

MUENKE, M.; SCHELL, U.; HEHR, A.; ROBIN, N.H.; LOSKEN, H.W.; SCHINZEL, A. et al. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. **Nature Genet**, 8: 269-274, 1994.

MUENKE, M. & SCHELL, U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. **TIG**, 11(8): 308-313, 1995.

MUENKE, M.; GRIPP, K.W.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; GAUDENZ, K.; WHITAKER, L.A.; BARTLETT, S.P. et al. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. **Am J Hum Genet**, 60: 555-564, 1997.

MULLER, U.; WARMAN, M.L.; MULLIKEN, J.B.; WEBER, J.L. Assignment of a gene locus involved in craniosynostosis to chromosome 5qter. **Hum Molec Genet**, 2: 119-122, 1993.

MULLER, U.; STEINBERGER, D.; KUNZE, S. Molecular genetics of craniosynostotic syndromes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 235(9):545-50, 1997.

NASCIMENTO, S.R.; DE MELLO, M.P.; BATISTA, J.C.; BALARIN, M.A.; LOPES, V.L. Clinical findings in four Brazilian families affected by Saethre-Chotzen syndrome without TWIST mutations. **Cleft Palate Craniofac J**, 41(3):250-5, 2004.

NASKI, M.C. & ORNITZ, D.M. FGF signaling in skeletal development. **Front Biosci**, 3: 781-94, 1998.

NASKI, M.C.; COLVIN, J.S.; COFFIN, J.D.; ORNITZ, D.M. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. **Development**, 125(24):4977-88, 1998.

NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGINO, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. **Nucleic Acids Res**, 25;18(20):6169, 1990.

- OLDRIDGE, M.; WILKIE, A.O.M.; SLANEY, S.F.; POOLE, M.D.; PULLEYN, L.J.; RUTLAND, P. et al. Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. **Hum Mol Genet**, 4: 1077-1082, 1995.
- OPPERMAN, L.A.; CHHABRA, A.; NOLEN, A.A.; BAO, Y.; OGLE, R.C. Dura mater maintains rat cranial sutures in vitro by regulating suture cell proliferation and collagen production. **J Craniofac Genet Dev Biol**, 18(3):150-158, 1998.
- OPPERMAN, L.A.; ADAB, K.; GAKUNGA, P.T. Transforming growth factor-beta 2 and TGF-beta 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell proliferation and apoptosis. **Dev Dyn**, 219(2):237-47, 2000.
- OPPERMAN, L.A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. **Dev Dyn**, 219(4): 472-85, 2000.
- ORNITZ, D.M. & ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, 2(3): REVIEWS3005. Epub 2001 Mar 09. Review, 2001.
- PARK, W.J.; BELLUS, G.; JABS, E.W. Mutations in fibroblast growth factor receptors: Phenotypic consequences during eukaryotic development. **Am J Hum Genet**, 57: 748 – 754, 1995.
- PASSOS-BUENO, M.R.; WILCOX, W.R.; JABS, E.W.; SERTIE, A.L.; ALONSO, L.G.; KITO, H. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. **Hum Mutat**, 14: 115-125, 1999.
- PAZNEKAS, W.A.; CUNNINGHAM, M.L.; HOWARD, T.D.; KORF, B.R.; LIPSON, M.H.; GRIX, A.W. et al. Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. **Am J Hum Gen**, 62(6): 1370-1380, 1998.

- PEREZ-CASTRO, A.V.; WILSON, J.; ALTHERR, M.R. Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and comparative sequence analysis with the mouse Fgfr3 gene. **Genomics**, 41: 10-16, 1997.
- PRZYLEPA, K.A.; PAZNEKAS, W.; ZHANG, M.; GOLABI, M.; BIAS, W.; BAMSHAD, M.J. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. **Nature Genet**, 13: 492-494, 1996.
- REARDON, W. & WINTER, R.M. Saethre-Chotzen syndrome. **J Med Genet**, 31: 393-396, 1994.
- REARDON, W.; WINTER, R.M.; RUTLAND, P.; PULLEYN, L.J.; JONES, B.M.; MALCOLM, S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. **Nat Genet**, 8(1):98-103, 1994.
- REARDON, W. Skeletal dysplasias detectable by DNA analysis. **Prenat Diagn**, 16(13):1221-36, 1996.
- REARDON, W.; WILKES, D.; RUTLAND, P.; PULLEYN, L.J.; MALCOLM, S.; DEAN, J.C. et al.: Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unisutural sporadic craniosynostosis. **J Med Genet**, 34(8): 632-6, 1997.
- REID, C.S.; MCMORROW, L.E.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; GRACE, K.J.; RAMOS, F.J.; ZACKAI, E.H. et al.: Saethre-Chotzen syndrome with familial translocation at chromosome 7p22. **Am J Med Genet**, 47(5): 637-639, 1993.
- RICE, D.P.; ABERG, T.; CHAN, Y.; TANG, Z.; KETTUNEN, P.J.; PAKARINEN, L. et al.: Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. **Development**, 127: 1845-55, 2000.

- ROBIN, N.H.; FELDMAN, G.J.; MITCHELL, H.F.; LORENZ, P.; WILROY, RS.; ZACKAI, E.H. et al.: Linkage of Pfeiffer syndrome to chromosome 8 centromere and evidence for genetic heterogeneity. **Hum Molec Genet**, 3: 2153-2158, 1994.
- ROBIN, N.H. Molecular genetic advances in understanding craniosynostosis. **Plast Reconstr Surg**, 103(3): 1060-70, 1999.
- ROSE, C.S.; KING, A.A.; SUMMERS, D.; PALMER, R.; YANG, S.; WILKIE, A.O. et al. Localization of the genetic locus for Saethre-Chotzen syndrome to a 6 cM region of chromosome 7 using four cases with apparently balanced translocations at 7p21.2. **Hum Mol Genet**, 3(8):1405-8, 1994.
- ROSE, C.S.; PATEL, P.; REARDON, W.; MALCOLM, S.; WINTER, R.M. The TWIST gene, although not disrupted in Saethre-Chotzen patients with apparently balanced translocations of 7p21, is muted in familial and sporadic cases. **Hum Mol Genet**, 6: 1369-1373, 1997.
- ROUSSEAU, F.; BONAVENTURE, J.; LEGEAI-MALLET, L.; PELET, A.; ROZET, J.M.; MAROTEAUX, P. et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. **Nature**, 371: 252-254, 1994.
- ROUSSEAU, F.; EL GHOUZZI, V.; DELEZOIDE, A.L.; LEGEAI-MALLET, L.; LE MERRER, M.; MUNNICH, A. et al: Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). **Hum Molec Genet**, 5: 509-512, 1996.
- RUTA, M.; HOWK, R.; RICCA, G.; DROHAN, W.; ZABELSHANSKY, M.; LAUREYS, G. et al. A novel protein tyrosine kinase gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation. **Oncogene**, 3: 9-15, 1988.
- RUTLAND, P.; PULLEYN, L.J.; REARDON, W.; BARAITSER, M.; HAYWARD, R.; JONES, B. et al. Identical mutations in FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon

syndrome phenotypes. **Nature Genet**, 9: 173-176, 1995.

SCHELL, U.; HEHR, A.; FELDMAN, G.J.; ROBIN, N.H.; ZACKAI, E.H.; DE DIE-SMULDERS, C. et al. Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. **Hum Mol Genet**, 4(3):323-328, 1995.

SETO, M.L.; LEE, S.J.; SZE, R.W.; CUNNINGHAM, M.L. Another TWIST on Baller-Gerold syndrome. **Am J Med Genet**, 104: 323-330, 2001.

SHIANG, R.; THOMPSON, L.M.; ZHU, Y.Z.; CHURCH, D.M.; FIELDER, T.J.; BOCIAN M. et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. **Cell**, 78: 335-342, 1994.

SHISHIDO, E.; HIGASHIJIMA, S.; EMORI, Y.; SAIGO, K. Two FGF-receptor homologues of Drosophila: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. **Development**, 117: 751-761, 1993.

SPIVAK-KROIZMAN, T.; LEMMON, M.A.; DIKIC, I.; LADBURY, J.E.; PINCHASI, D.; HUANG, J. et al. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. **Cell**, 79(6): 1015-24, 1994.

TARTAGLIA, M.; DI ROCCO, C.; LAJEUNIE, E.; VALERI, F.; BATTAGLIA, P.A. Jackson-Weiss syndrome: identification of two novel FGFR2 missense mutations shared with Crouzon and Pfeiffer craniosynostotic disorders. **Hum Genet**, 101: 47-50, 1997.

TAVORMINA, P.L.; SHIANG, R.; THOMPSON, L.M.; ZHU, Y.Z.; WILKIN, D.J.; LACHMAN, R.S. et al. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. **Nature Genet**, 9: 321-328, 1995.

- THISSE, B.; STOETZEL, C.; GOROSTIZA-THISSE, C.; PERRIN-SCHMITT, F.
Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. **EMBO J**, 7(7): 2175-2183, 1988.
- TSUJI, K.; NARAHARA, K.; YOKOYAMA, Y.; GRZESCHIK, K.H.; KUNZ, J. The breakpoint on 7p in a patient with t(6;7) and craniosynostosis is spanned by a YAC clone containing the D7S503 locus. **Hum Genet**, 95: 303-307, 1995.
- van HERWERDEN, L.; ROSE, C.S.; REARDON, W.; BRUETON, L.A.; WEISSENBAACH, J.; MALCOLM, S. et al.: Evidence for locus heterogeneity in acrocephalosyndactyly: a refined localization for the Saethre-Chotzen syndrome locus on distal chromosome 7p— and exclusion of Jackson-Weiss syndrome from craniosynostosis loci on 7p and 5q. **Am J Hum Genet**, 54(4):669-74, 1994.
- WARMAN, M.L.; MULLIKEN, J.B.; HAYWARD, P.G.; MULLER, U. Newly recognized autosomal dominant disorder with craniosynostosis. **Am J Med Genet**, 46: 444-449, 1993.
- WILKIE, A.O.M.; YANG, S.P.; SUMMER, D.; POOLE, M.D.; REARDON, W.; WINTER, R.M. Saethre-Chotzen syndrome associated with balanced translocations involving 7p21: three further families. **J Med Genet**, 32: 174-180, 1995.
- WILKIE, A.O.M.; SLANEY, S.F.; OLDRIDGE, M.; POOLE, M.D.; ASWORTH, G.J.; HOCKLEY, A.D. et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. **Nature Genet**, 9: 165-172, 1995.
- WILKIE, A.O.M. Craniosynostosis: genes and mechanisms. **Hum Mol Genet**, 6(10): 1647-1656, 1997.
- WILKIE, A.O.M.; TANG, Z.; ELANKO, N.; WALSH, S.; TWIGG, S.R.F.; HURST, J.A. et al. Functional haploinsufficiency

of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. **Nature Genet**, 24: 387-390, 2000.

WILKIE, A.O.M. & MORRISS-KAY, G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. **Nature Rev Genet**, 2: 458-468, 2001.

WILKIE, A.O.M. Abnormal spliceform expression associated with splice acceptor mutations in exon IIIc of FGFR2. **Am J Med Genet**, 111(1):105, 2002.

WUYTS, W.; REARDON, W.; PREIS, S.; HOMFRAY, T.; RASORE-QUARTINO, A.; CHRISTIANS, H. et al. Identification of mutations in the MSX2 homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. **Hum Mol Genet**, 9(8):1251-1255, 2000.

YOUSFI, M.; LASMOLES, F.; LOMRI, A.; DELANNOY, P.; MARIE, P.J. Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. **J Clin Invest**, 107(9):1153-61, 2001.

ZACKAI, E.H. & STOLLE, C.A. A new TWIST: some patients with Saethre-Chotzen syndrome have a microdeletion syndrome. **Am J Hum Genet**, 63: 1277-1281, 1998.

ZHANG, H.; HU, G.; WANG, H.; SCIAVOLINO, P.; ILER, N.; SHEN, M.M. et al. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. **Mol Cell Biol**, 17(5):2920-32, 1997.

ZHOU, Y.X.; XU, X.; CHEN, L.; LI, C.; BRODIE, S.G.; DENG, C.X. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. **Hum Molec Genet**, 9: 2001-2008, 2000.

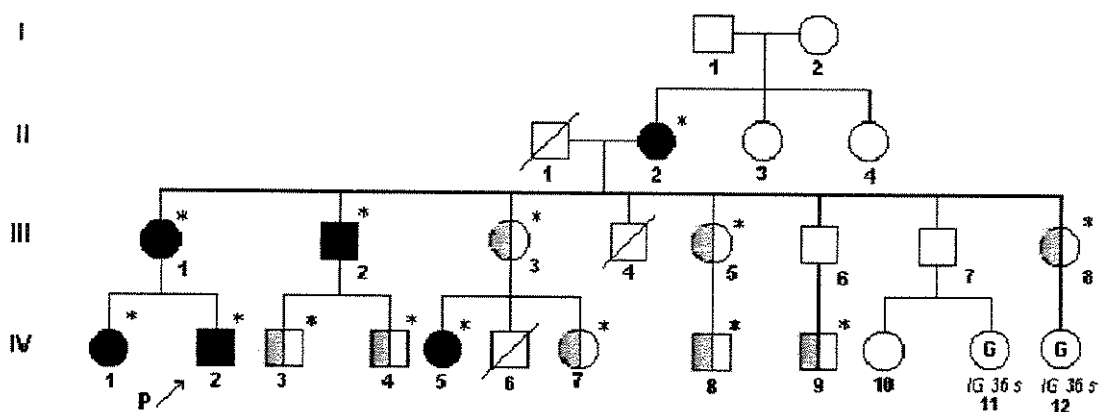
8. *ANEXOS*

ANEXO 1: HEREDOGRAMAS DOS CASOS FAMILIARES

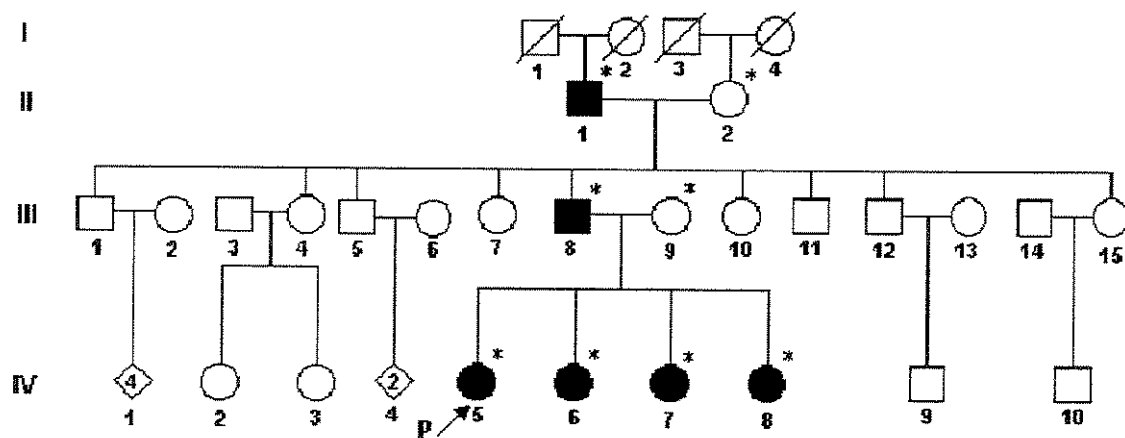
Legenda: P ↗ propósito * indivíduo examinado □ ∅ óbito △ aborto

■ ● indivíduo afetados ▨ ▩ indivíduo com sinais clínicos brandos (G) gestação

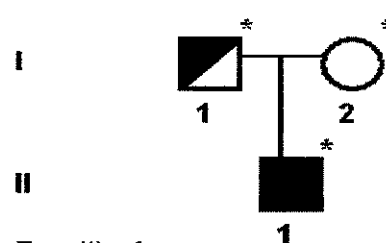
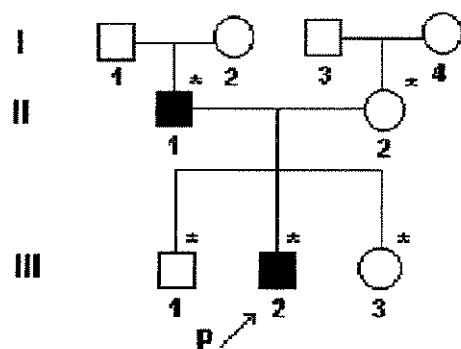
Família 1



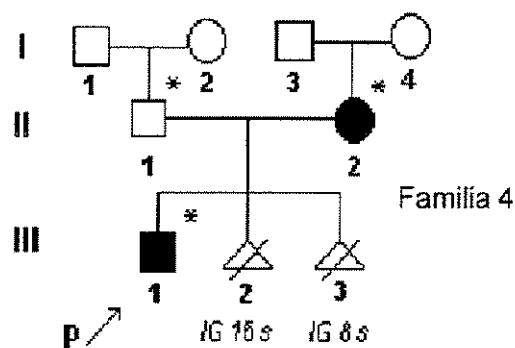
Família 2



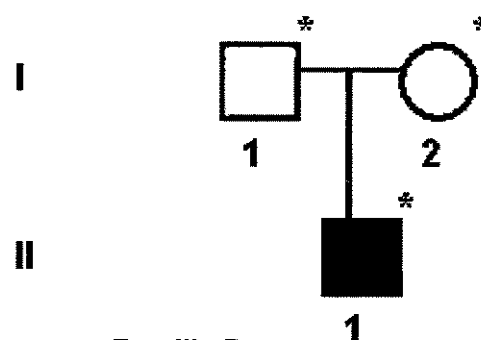
Familia 3



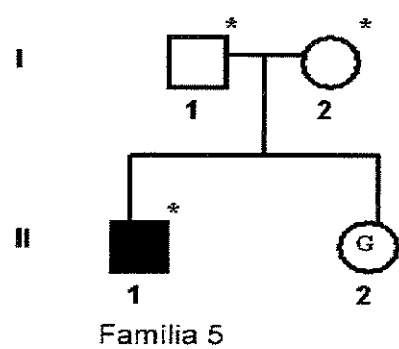
Familia 6



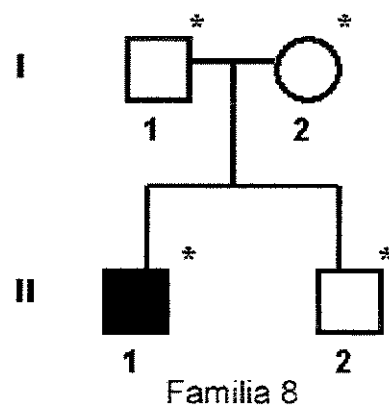
Familia 4



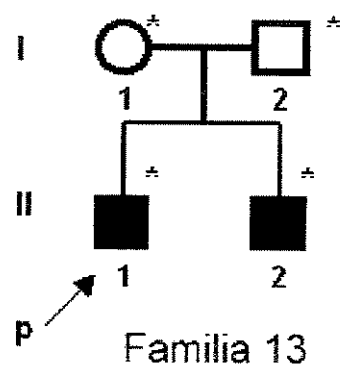
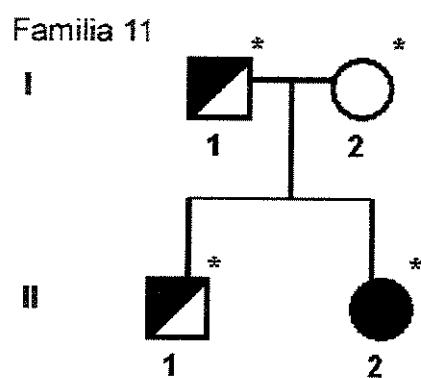
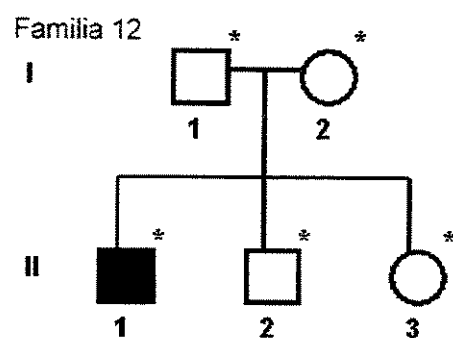
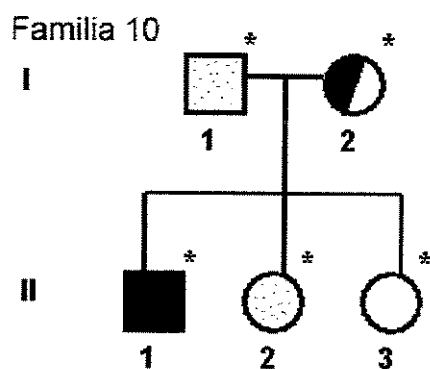
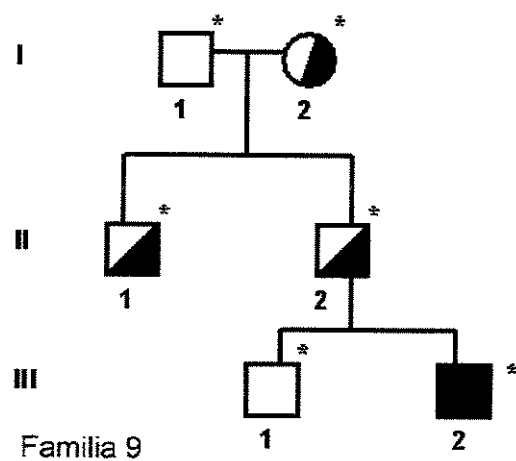
Familia 7



Familia 5



Familia 8



ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: ESTUDO DE CRANIOSSINOSTOSES POR MEIO DE INVESTIGAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ESPECÍFICAS

Eu confirmo que o (a) Dr.(a): _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais o indivíduo que participará do estudo, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo

Família No. _____ Registro no Hospital de Origem: _____

Nome do paciente: _____

Nome do responsável: _____

Idade: _____ Parentesco: _____ R.G.: _____

Endereço e telefone para contato: _____

Assinatura do participante ou responsável _____ data _____

Nome da testemunha _____

Assinatura da testemunha _____ data _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

_____ Nome
do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado _____ data _____