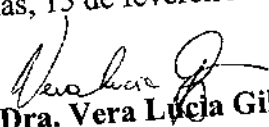


C2

BERNARDO LAMARTINE NOGUEIRA PASSARINHO

**ESTUDOS MOLECULARES DE CRANIOSSINOSTOSES
COM ÊNFASE NA MUTAÇÃO Q289P DO GENE FGFR2**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno Bernardo Lamartine Nogueira Passarinho.
Campinas, 15 de fevereiro de 2008.


Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes
Orientadora

CAMPINAS

Unicamp

2008

i



BERNARDO LAMARTINE NOGUEIRA PASSARINHO

**ESTUDOS MOLECULARES DE CRANIOSSINOSTOSES
COM ÊNFASE NA MUTAÇÃO Q289P DO GENE FGFR2**

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 Ciências Biomédicas

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

P266e Passarinho, Bernardo Lamartine Nogueira
Estudos moleculares de craniossinostoses com ênfase na mutação
Q289P do gene FGFR2 / Bernardo Lamartine Nogueira Passarinho.
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Craniossinostose. I. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Molecular studies of craniosynostosis and the mutation Q289P in the
FGFR2 gene**

Keywords: • Craniosynostosis

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Prof. Dr. Luis Garcia Alonso

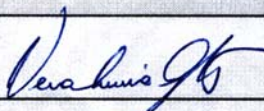
Data da defesa: 15 - 02 - 2008

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado -
Bernardo Lamartine Nogueira Passarinho**

Orientador: Prof Dr. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Membros:

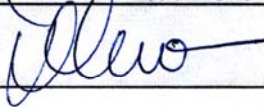
1. Prof. Dr. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes-



2. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo -



3. Profa. Dra. Débora Gusmão Melo -



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

Data: 15/02/2008

*Aos meus pais,
a quem vou sempre dedicar
todas as minhas vitórias,
pelo apoio
em todas as minhas decisões,
pela liberdade e confiança
nos caminhos que eu escolhi,
pelo respeito e pela educação
que tanto me deram e
pelo amor
que sempre me dedicaram.
Mesmo longe
sempre
estiveram ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre guiou, me ensinou e auxiliou.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, por ter acreditado em mim, pela amizade e por ter me dado a oportunidade de mais uma conquista.

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo, sempre.

Aos professores da banca e pré-banca que participaram e contribuíram para tornar esse trabalho mais completo e conciso.

Aos alunos da professora Vera Lopes, Érika Freitas, Milena Simioni e Társis Vieira pela amizade, companheirismo e ajuda dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos demais colegas e amigos que também foram muito importantes para mim, Aline Marcelino, Anderson Tavares, André Zamboni, Carol Lincoln, Cláudia Morelli, Daniela e Denílson Kolls, Fábio Conte, Fábio Torres, Fabíola Monteiro, Karina Cunha, Luciana Bonadia, Madá, Marcelo Murai, Marilza Santos, Marina Gonsales, Rafael Marchesini, Rafael Queiroz, Renato Santos, Roberto Barbarini, Rodrigo Secolin, Romênia Domingues, Simone Tsuneda, Tatiany Marques e Teresa Chiodetto, pelo auxílio técnico e, principalmente, pela amizade.

E, finalmente, aos pacientes e familiares que participaram desse estudo.

	Pág.
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1- INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1- Introdução	17
1.2- Embriologia do crânio	19
1.3- Aspectos moleculares das craniossinostoses	20
1.3.1- FGFR1.....	25
1.3.2- FGFR2.....	25
1.3.3- FGFR3.....	28
1.3.4- TWIST1.....	29
1.4- Investigação das craniossinostoses	31
1.5- A Mutação Q289P e sua importância	32
1.6- Análise computacional	33
2- OBJETIVOS	34
3- CAPÍTULO	36
3.1- Abstract	39
3.2- Introduction	40
3.3- Methods	42
3.3.1- Population analysis.....	42
3.3.2- Bioinformatic analysis.....	43

3.4- Results.....	44
3.4.1- Investigation of the Q289P frequency in the FGFR2 gene.....	44
3.4.2- Complementary investigation of the studied family.....	45
3.4.3- Computational analyses.....	45
3.5- Discussion.....	45
3.6- Conclusions.....	49
3.7- References.....	51
4- DISCUSSÃO GERAL.....	58
5- CONCLUSÃO GERAL.....	60
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
7- ANEXOS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	Acrocefalossindactlia
ACP	Acondroplasia
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
BS	<i>Beare-Stevenson cutis girata</i>
BSP	<i>Sialoproteína Óssea</i>
Cbfa1	<i>Core-binding factor alpha subunit 1</i>
CDE	Síndrome Crouzonodermoesquelal
CNS	Craniossinostose não-sindrômica
C01a1	Colágeno tipo I
DCF	Disostoses craniofaciais
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DO	Displasia Osteoglofônica
DT	Displasia Tanatofórica
EFNB1	<i>EPH-Related Tyrosine Kinase Ligand 2</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
HCP	Hipocondroplasia
HGMD	<i>Human Genome Mutation Database</i>
HS	<i>Heparan Sulfate</i>
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i>
MSX	<i>Muscle Segment Homeobox</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

OC	Osteocalcina
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OPN	Osteopontina
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
POR	<i>Cytochrome P450 Oxido Reductase</i>
PSI-BLAST	<i>Position Specific Iterative - Basic Local Alignment Search Tool</i>
PSIC	<i>Position-Specific Independent Counts</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
S	Síndrome
SA	Síndrome de Apert
SC	Síndrome de Crouzon
SDCC	Sem Diagnóstico Clínico Conclusivo
SIFT	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
SJW	Síndrome de Jackson-Weiss
SK	Síndrome de Kallmann
SM	Síndrome de Muenke
SP	Síndrome de Pfeiffer
SSC	Síndrome de Saethre-Chotzen
TK	<i>Tyrosine Kinase</i>
TM	<i>Transmembrane</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTA DE TABELAS

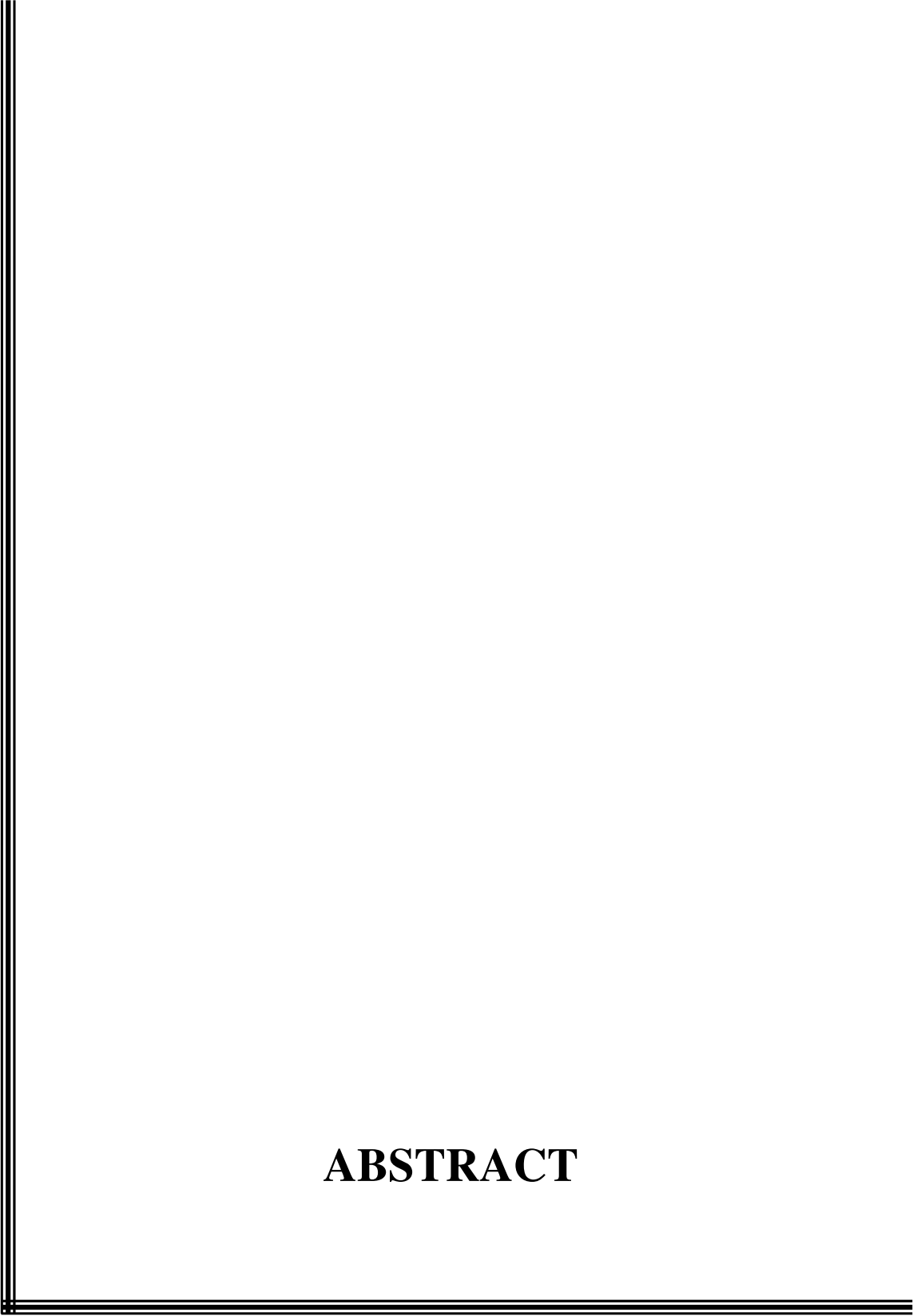
	Pág.
Tabela 1 Condições clínicas associadas a genes de desenvolvimento.....	21
Tabela 2 Isoformas criadas por splicing e seus ligantes específicos.....	22

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Alterações do formato do crânio.....	17
Figura 2 Modelação do crânio em função da expansão cerebral.....	20
Figura 3 Modelo do mecanismo de ativação do complexo FGF-Heparina-FGFR2.....	23
Figura 4 Modelo proposto de interação entre moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição.....	24
Figura 5 Mutações nos genes FGFRs.....	26
Figura 6 Isoformas variantes criadas por splicing alternativo dos éxons 8 e 9 do gene FGFR2.....	27
Figura 7 Esquematização da estrutura bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) dimerizada com o DNA.....	30
Figura 8 Algoritmo para a investigação de craniossinostoses síndrômicas.....	32
Figura 9 Family pedigree.....	41
Figura 10 Eletrophoresis of the Q289P mutation digestion in agarosis gel.....	44

RESUMO

A família dos genes FGFRs está envolvida na via molecular que participa na modulação do desenvolvimento craniofacial e de membros em humanos. Mutações nos genes FGFR1, FGFR2 e FGFR3 têm sido associadas a uma variedade de fenótipos diferentes com presença de craniossinostose ou outras deformidades ósseas. O gene FGFR2 codifica um receptor do fator de crescimento de fibroblastos. No éxon IIIa deste gene, foi identificada a mutação Q289P, a qual foi descrita em casos isolados e em famílias com craniossinostoses síndrômicas, incluindo uma com S. de Jackson-Weiss, outra com S. de Pfeiffer e uma, relatada por nosso grupo de pesquisa, com quadro clínico de S. de Saethre-Chotzen. Nesta última, entretanto, como nem todos os indivíduos afetados apresentavam esta mutação, algumas hipóteses foram aventadas. Entre elas, a de que esta mutação produza uma proteína moduladora do mecanismo do fechamento prematuro das suturas, ou, ainda que esta seja, na verdade, um polimorfismo de baixa frequência não relacionado a craniossinostoses. O presente trabalho teve como objetivo testar estas hipóteses. Foi realizada a análise populacional da referida mutação em dois grupos constituídos por 40 indivíduos portadores de síndromes de craniossinostoses e 200 indivíduos de uma amostra da população. Foram pesquisadas mutações nos principais pontos relacionados à craniossinostoses nos genes FGFR1, FGFR2 e FGFR3 nos indivíduos da família-índice que já havia sido previamente investigada para mutações no gene TWIST1. Foram também aplicados testes *in silico*, a fim de simular os efeitos da mutação Q289P na proteína e prever seu potencial deletério. A mutação Q289P não foi identificada nos grupos controle e de portadores de síndromes de craniossinostoses. De acordo com os achados obtidos, sugere-se que a mutação Q289P seja deletéria, rara e associada apenas ao fenótipo craniano, e não fortemente associada com o fenótipo facial e neurológico presente em alguns membros da família estudada. Existem fortes indícios de que a mutação Q289P no gene FGFR2 esteja relacionada à ocorrência de craniossinostoses. Estudos futuros de investigação experimental da função protéica poderão contribuir para melhor esclarecer os mecanismos patogênicos envolvidos na fusão precoce das suturas cranianas.



ABSTRACT

The FGFRs family is involved in the molecular pathway which plays a role in modulation of the craniofacial and members development in humans. Mutations in genes FGFR1, FGFR2 and FGFR3 have been associated to different phenotypes presenting craniosynostosis and other bone diseases. The FGFR2 gene codifies a fibroblast growth factor receptor. The mutation Q289P was identified in the IIIa exon of this gene, described in isolated cases and some craniosynostosis syndromes, including a Jackson-Weiss family, a Pfeiffer family, a Crouzon family and a Saethre-Chotzen family. The latter family was previously reported by FREITAS *et al.* (2006). In this specific family, all of the patients who had the Q289P mutation presented craniosynostosis, but not all of those who had facial and neurological features had the mutation, therefore some hypothesis were suggested. The mutation could generate a modified regulatory protein of skull sutures closure, or the mutation could be a low frequency polymorphism or it can be completely responsible for the Saethre-Chotzen features found in the affected members of the family. The aim of this study was to test those hypotheses. A population analysis was performed in a group of 200 control individuals and a group of 40 nonrelated syndromic craniosynostosis individuals. Secondary mutations were searched in the FGFR1, FGFR2 and FGFR3 genes in the family first described by FREITAS and in the craniosynostosis group. The TWIST1 gene was investigated in the syndromic craniosynostosis individual's group but, in the analyzed family, this gene has been previously tested by NASCIMENTO *et al.*, (2004). Also, computational approaches were applied to simulate the effects of the analyzed mutation in the protein and predict its deleterious potencial. According to those findings, we suggest that the Q289P mutation is deleterious and associated to the craniosynostosis phenotype only, and not strongly related to the facial and neurological phenotype.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Introdução

As craniossinostoses são anomalias craniofaciais que podem acometer o indivíduo desde a vida intra-uterina e são definidas como a fusão prematura de uma ou mais suturas dos ossos chatos do crânio, acarretando conformação craniana anormal. Sua incidência geral na população é de 1 em 2500 nativos (MORRIS-KAY e WILKIE, 2005). 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.

As craniossinostoses podem ocorrer devido à interação de fatores ambientais (mecânicos) com fatores genéticos (multifatoriais ou monogênicos) (WILKIE, 1997).

A grande maioria das craniossinostoses é isolada, ocorrendo em pacientes com nenhuma outra anormalidade e sendo classificadas de acordo com as suturas prematuramente fechadas (Figura 1).

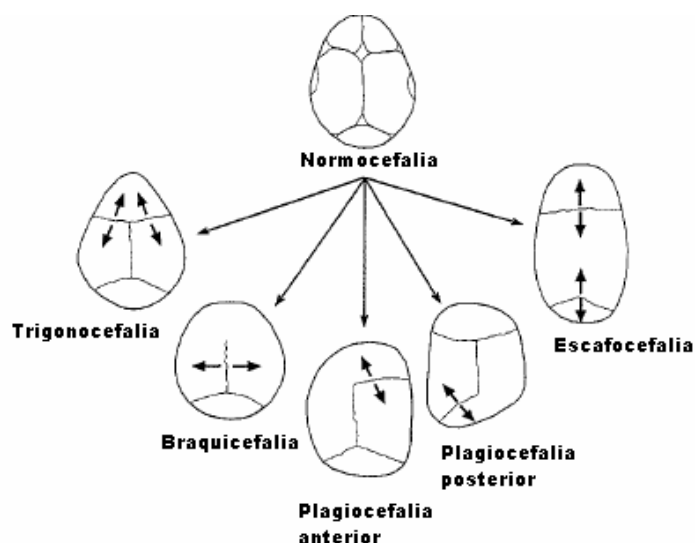


Figura 1- Alterações do formato do crânio. A trigonocefalia é resultado do fechamento prematuro da sutura metópica. A braquicefalia e plagiocefalia anterior são resultantes do fechamento prematuro das suturas coronais, bilateral ou unilateral, respectivamente. A escafocefalia é resultado do fechamento prematuro da sutura sagital. Tanto a braquicefalia como a trigonocefalia podem ocorrer sem o fechamento de suturas (adaptado de COHEN 2005).

O momento no qual as suturas são fechadas está relacionado com o comprometimento do formato craniano. O fechamento das suturas pode ocorrer no período pré-natal ou apenas durante a infância, sendo as alterações, nesse último caso, mais brandas (COHEN e MACLEAN, 2000). A forma mais grave de craniossinostose é conhecida como crânio em trevo por gerar um crânio trilobulado como resultado do fechamento prematuro de várias suturas. As suturas envolvidas podem ser as suturas metópica, coronais, lambdóides e sagital. Normalmente está associado a fenótipos graves (COHEN, 2000).

Em muitos casos isolados, a causa da craniossinostose é secundária, ou seja, pode ser resultado de desordens hematológicas ou metabólicas ou de fatores ambientais como alterações mecânicas, infecções intra-uterinas, drogas ou traumas (MULLER *et al.*, 1997).

As craniossinostoses podem se apresentar também como parte de quadros de anomalias congênitas múltiplas. Raramente são encontradas craniossinostoses isoladas familiares (COHEN, 1986). MORRIS-KAY e WILKIE, avaliando 214 pacientes com alguma forma de craniossinostose, observaram que 54% dos casos eram resultado de craniossinostoses isoladas, 44% eram resultado de craniossinostoses síndrômicas e 2% resultantes de alterações cromossômicas (MORRIS-KAY e WILKIE, 2005).

A maioria das síndromes de craniossinostose possui padrão de herança autossômico dominante e expressividade variável, com portadores muitas vezes apresentando sinais clínicos discretos.

As sobreposições fenotípicas, que dificultam o diagnóstico clínico, ocorrem por formação anômala de condrocrânio (ossificação endocondral irregular) ou do neurocrânio (ossificação intramembranosa) e resultam em hipertelorismo ocular, proeminência ocular, nariz em bico, hipodesenvolvimento de face média, anomalias variáveis de mãos e pés, além de craniossinostose (GRIPP *et al.*, 1999). Quando são acompanhadas por anomalias de membros, sugerem que aspectos do desenvolvimento craniofacial e de membros utilizem caminhos moleculares comuns (WILKIE, 1997).

Dentre os quadros de craniossinostoses síndrômicas, destacam-se as chamadas Acrocefalossindactilias (ACS) e as Disostoses craniofaciais (DCF). No grupo das acrocefalossindactilias, estão incluídas a Síndrome de Apert (ACS Tipo I, OMIM 101200),

Síndrome de Pfeiffer (ACS Tipo V, OMIM 101600) e Síndrome de Saethre-Chotzen (ACS Tipo III, OMIM 101400). As duas primeiras têm prevalência estimada de 1:100.000 nativos, ao passo que, a Síndrome de Saethre-Chotzen possui sua prevalência em torno de 1:25.000. Entretanto, esta última tem expressividade bastante variável, o que pode acarretar dificuldade na confirmação diagnóstica. Por sua vez, dentre as disostoses craniofaciais, destaca-se a Síndrome de Crouzon (DCF Tipo I, OMIM 123500), cuja prevalência foi estimada em 1:60.000 nativos (COHEN e KREIBORG, 1992).

Essas diferentes condições clínicas ocorrem por interferência nas vias de regulação gênica durante a formação das suturas cranianas, modificando o desenvolvimento embriológico normal.

1.2- Embriologia do crânio

O tecido craniano é desenvolvido a partir das células mesenquimais da mesoderme e da crista neural (SULIK, 1990). O processo de ossificação se inicia na 8ª semana de gestação. Existem dois tipos conhecidos de ossificação, gerando células histologicamente diferenciadas. A ossificação endocondral é um processo que leva à transformação do mesênquima em condrócitos, que se hipertrofiam e liberam altas quantidades de colágeno X e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) em sua matriz celular (GERBER et al., 1999; SPERBER, 2001). O VEGF promove a invasão de vasos sanguíneos no tecido que irão gerar os osteoblastos e osteoclastos. Em seguida as células endocondrais sofrem apoptose e são progressivamente substituídas por osso trabecular e medula óssea. Esse tipo de ossificação é responsável pela formação dos ossos da base do crânio e pelos ossículos do ouvido médio. Já a ossificação do tipo intermembranosa, leva à diferenciação das células mesenquimais em tecido ósseo, sem a formação de um tecido cartilaginoso intermediário, formando os osteoblastos, que são responsáveis pela mineralização e liberação de colágeno na matriz celular (OLSEN et al., 2000). Dessa forma, o crescimento desses ossos ocorre através da proliferação e diferenciação dos osteoblastos nas extremidades ósseas. Esse processo é responsável pela formação dos ossos chatos do crânio e da face.

Os ossos do crânio também são definidos de acordo com sua localização, sendo dividido em neurocrânio, que representa os ossos responsáveis pela proteção ao encéfalo, e viscerocrânio, o esqueleto da face.

Os ossos do neurocrânio são separados por suturas, que são áreas fibrosas que tornam possível o acompanhamento do crescimento do crânio em relação ao encéfalo (GOVINDARAJAN *et al.* 2006). As principais suturas são a sutura metópica, que separa os ossos frontais, a sutura sagital, que separa os ossos parietais, as suturas lambdóides, que separam os ossos parietais do occipital e as suturas coronárias, que separam os ossos parietais dos frontais.

As suturas são preenchidas por juntas fibrosas que permitem a modelação do crânio durante o nascimento (Figura 2). O fechamento das suturas só é concluído por volta dos vinte anos de idade, entretanto esse processo é contínuo e gradual após o nascimento, de forma que a sutura metópica é a primeira a ser fundida durante a infância.



Figura 2- Modelação do crânio em função da expansão cerebral. Demonstração esquemática de forças de tensão, geradas pela expansão do cérebro, aplicadas sobre suturas do neurocrânio. (Adaptado de SPERBER, 2001).

1.3- Aspectos moleculares das craniossinostoses

A formação e o desenvolvimento do crânio estão relacionados a um complexo mecanismo de regulação gênica. Os principais genes envolvidos nessa regulação que estão relacionados às craniossinostoses são: FGFR1 (8p12-p11.2), FGFR2 (10q26), FGFR3 (4p16) e TWIST1 (7p21-22) embora outros genes já tenham sido descritos (WILKIE *et al.*, 1995; WILKIE e WALL., 1996; OLDRIDGE *et al.*, 1997; WHITE *et al.*,

2005; COHEN., 2006). Algumas condições clínicas associadas a estes genes estão relatadas na tabela 1. As mutações descritas nesses genes, em sua maioria, são dominantes. Mutações nos genes FGFR1, FGFR2 e FGFR3 sempre geram ganho de função, o que aumenta a afinidade dos receptores pelos seus ligantes, por isso são chamadas mutações de ativação constitutiva. Por outro lado, microdeleções e mutações no gene TWIST1 causam haploinsuficiência. A haploinsuficiência pode ser resultado de mutações que inserem códons de parada prematuramente, alteram a matriz de leitura ou mutações *nonsense* que geram produto protéico não funcional (PAZNEKAS *et al.*, 1998; EL GHOUZZI *et al.*, 1999; COHEN, 2004).

Tabela 1- Condições clínicas associadas a genes de desenvolvimento.

FGFR1	Síndrome de Pfeiffer
	Trigonocefalia não sindrômica
FGFR2	Síndrome de Apert
	Síndrome de Pfeiffer
	Síndrome de Crouzon
	Síndrome de Saethre-Chotzen
	Síndrome de Jackson-Weiss
	Síndrome de Beare-Stevenson
FGFR3	Síndrome de Crouzon
	Síndrome de Muenke
TWIST1	Síndrome de Saethre-Chotzen
	Plagiocefalia sinostótica frontal
MSX2	Craniossinostose tipo Boston
EFNB1	Síndrome Craniofrontonasal
POR	Síndrome de Antley-Bixler

A Família dos genes FGFR é constituída por 4 membros (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4), com sequências de aminoácidos que foram conservadas durante a evolução. Como todos os receptores tirosino-quinases, os FGFRs são constituídos por um domínio de ligação extracelular que possui três domínios imunoglobulina-*like* D1, D2 e D3, um único domínio transmembranar e um domínio citoplasmático contendo sequências de regulação e o núcleo tirosino-quinase (SCHLESSINGER, 2000a).

O *splicing* alternativo está presente nos receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR3, ocorrendo geralmente no terceiro domínio da imunoglobulina-*like* (D3) criando as isoformas FGFR1b e FGFR 1c, FGFR 2b (IIIb) e FGFR 2c (IIIc) e FGFR3b e FGFR3c, respectivamente. As variantes criadas possuem especificidade de ligação diferente para seus ligantes. Apenas o receptor FGFR4 não sofre *splicing* alternativo (MIKI *et al.*, 1992; YAYON *et al.*, 1992) (Tabela 2).

Os FGFRs diferem uns dos outros pelas suas afinidades de ligação e distribuição nos tecidos expressos (PASSOS-BUENO *et al.*, 1999). Esses fatores são ativados pelos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs).

Tabela 2- Isoformas criadas por *splicing* e seus ligantes específicos. Adaptado de ESWARAKUMAR *et al.*, 2005.

Isoforma	Ligantes específicos
FGFR1b	FGF 1, 2, 3 e 10
FGFR1c	FGF 1, 2, 4, 5 e 6
FGFR2b	FGF 1, 3, 7, 10 e 22
FGFR2c	FGF 1, 2, 4, 6, 9, 17 e 18
FGFR3b	FGF 1 e 9
FGFR3c	FGF 1, 2, 4, 8, 9, 17, 18 e 23
FGFR4	FGF 1, 2, 4, 6, 8, 9, 16, 17 , 18 e 19

Os 22 fatores de crescimento de fibroblastos identificados são moléculas essenciais para o desenvolvimento de todos os mamíferos (ORNITZ *et al.*, 1996; ESWARAKUMAR *et al.*, 2005). Os FGFs possuem uma expressão espaço-temporal determinada e estão associados a diversos processos biológicos como angiogênese, migração celular, cura de tecidos danificados da derme e tumorigênese (THOMAS, 1987; BASILICO e MOSCATELLI, 1992). Os FGFs se ligam à heparina ou sulfato de heparan (Figura 3), que funcionam como mediadores de ligação e ativação dos FGFRs aos quais os FGFs possam estar ligados (SPIVAK-KROIZMAN *et al.*, 1994; YAYON *et al.*, 1991). No domínio extracelular, há uma região conservada e carregada positivamente em D2 que serve como sítio de ligação para a heparina (SCHLESSINGER *et al.*, 2000b).

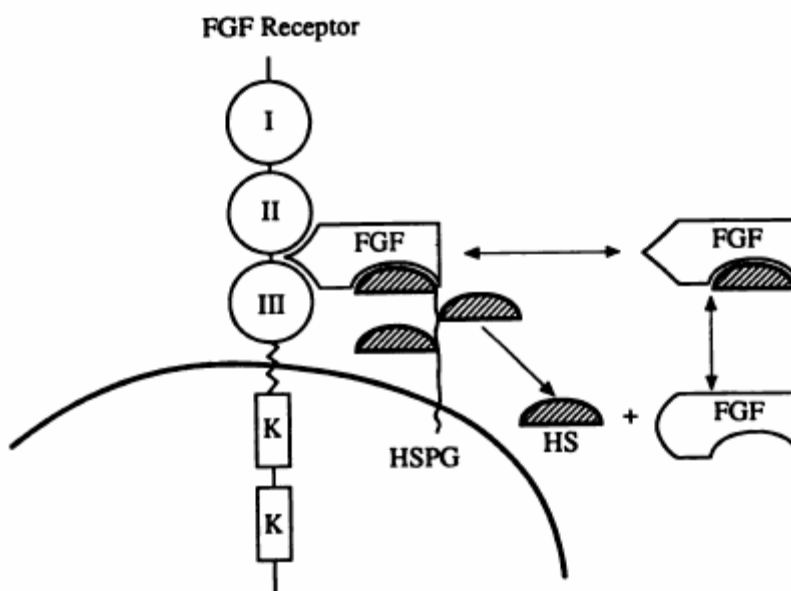


Figura 3- Modelo do mecanismo de ativação do complexo FGF-Heparina-FGFR2.

Modelo celular representando a ativação de um receptor FGFR pelo complexo FGF-Heparina. O FGF ativa seu receptor apenas quando unido à molécula heparina-*like* na superfície celular (HSPG) ou à heparina solúvel livre (HS). (GIVOL e YAYON, 1992).

O gene TWIST1 é expresso no mesênquima de suturas em desenvolvimento e atua diminuindo a maturação dos osteoblastos e inibindo o gene FGFR2 nas suturas (JOHNSON *et al.*, 2000; RICE *et al.*, 2000). Portanto, mutações no gene TWIST1 que resultam em haploinsuficiência ou diminuição da sua expressão, levam à maturação precoce de osteoblastos e, conseqüentemente, à fusão prematura das suturas (OPPERMAN, 2000). O FGF2 possui um papel indutor da expressão do TWIST1, participando do desenvolvimento normal das suturas (OPPERMAN, 2000) (Figura 4).

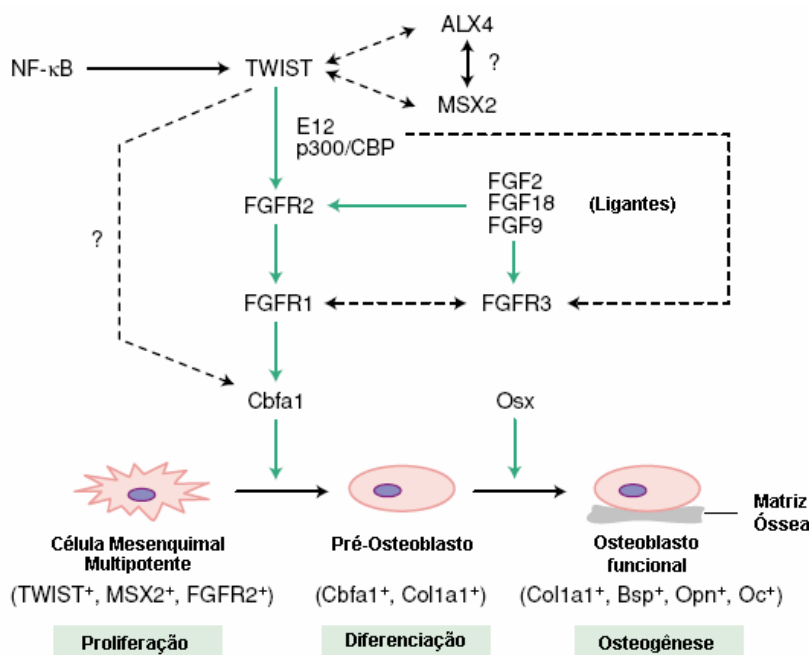


Figura 4- Modelo proposto de interação entre moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição. Esse modelo de interação entre moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição sugere como os FGFs e os seus receptores FGFRs podem interagir com os fatores de transcrição TWIST, MSX2, ALX4, Cbfa1 e Osx. Setas contínuas indicam forte evidência de interação, enquanto setas descontínuas indicam que informações conclusivas adicionais ainda são necessárias e interações hipotéticas são representadas por uma interrogação. Pré-Osteoblastos e Osteoblastos funcionais produzem colágeno do tipo I (Col1a1), sialoproteína óssea (Bsp), Osteopontina (Opn) e Osteocalcina (Oc), que são depositados nas extremidades osteogênicas durante a formação das suturas. FGFs 2, 9 e 18 são expressos pelas células mesenquimais nas suturas em desenvolvimento (BONAVENTURE e EL GHOUZZI, 2003).

1.3.1- FGFR1

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 o desenvolvimento germinativo dos membros.

ROBIN *et al.* (1994) observaram as primeiras ligações entre pacientes com Pfeiffer e uma mutação no gene FGFR1 (P252R) localizado no cromossomo 8. Até hoje, nesse gene, somente a mutação P252R foi descrita em casos com craniossinostoses. Outras mal formações associadas à esse gene são a síndrome de Kallmann (DODÊ *et al.*, 2003; ALBUISSON *et al.*, 2005) e trigonocefalia não-sindrômica (KRESS *et al.*, 2000).

As variantes 1b e 1c possuem distribuição têmporo-espacial únicas. Enquanto a isoforma 1b tem expressão geralmente fraca na calvária e suturas quando comparado com outros FGFRs, a isoforma 1c foi detectada nos ossos da calvária, principalmente nas frentes osteogênicas, sítios de grande condensação e diferenciação de osteoblastos e cartilagens da cabeça (RICE *et al.*, 2000).

1.3.2- FGFR2

O FGFR2 é o receptor que está ligado ao maior número de entidades clínicas diferentes, incluindo a S. de Apert (WILKIE *et al.*, 1995), S. de Crouzon (REARDON *et al.*, 1994), S. de Pfeiffer (RUTLAND *et al.*, 1995; LAJEUNIE *et al.*, 1995; SCHELL *et al.*, 1995), S. de Jackson-Weiss (JABS *et al.*, 1994), S. de Beare-Stevenson (PRZYLEPA *et al.*, 1996), S. de Saethre-Chotzen (PAZNEKAS *et al.*, 1998), entre outras. A figura 5 ilustra a localização das principais mutações nos domínios da proteína FGFR e as síndromes associadas a elas.

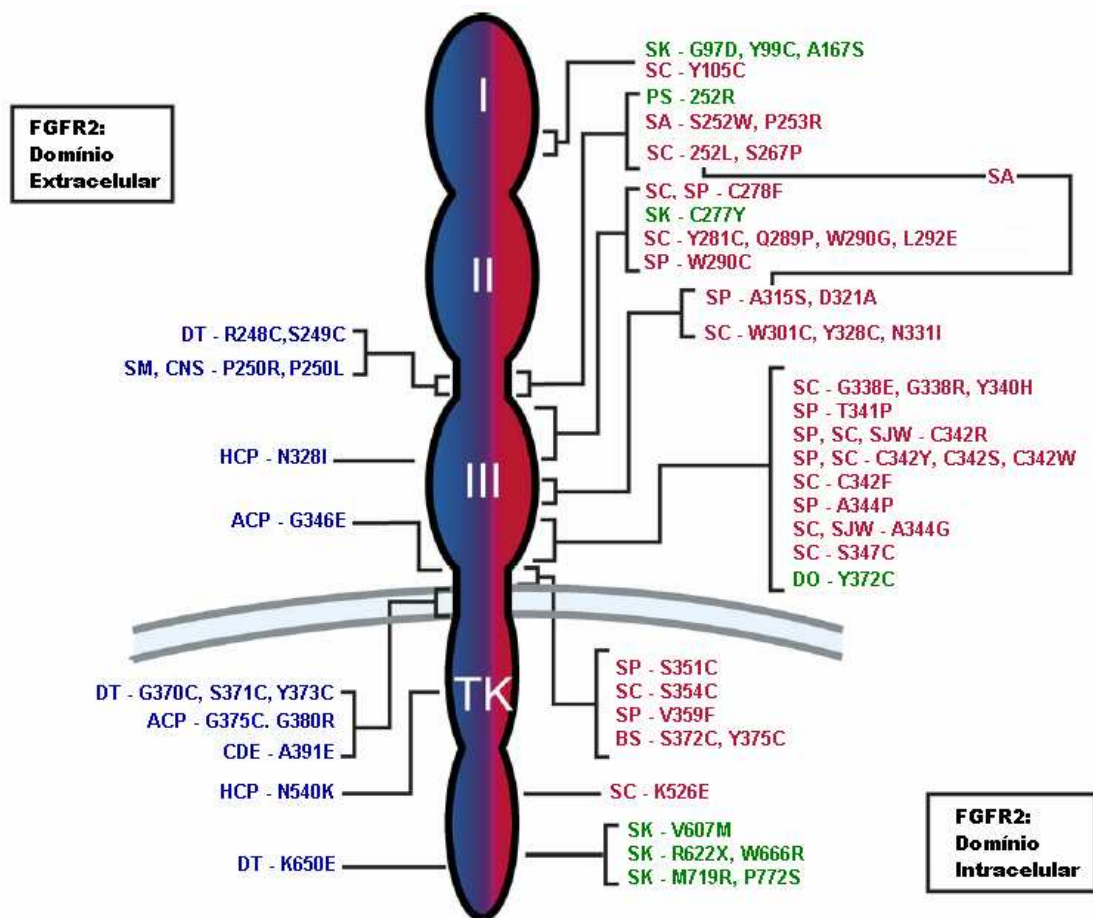


Figura 5- Localização das mutações mais comuns nos FGFRs. Esquerda (azul): Mutações no gene FGFR3. Direita (vermelho): Mutações no gene FGFR2. Direita (verde): Mutações no gene FGFR1. Displasia Tanatofórica (DT), Síndrome de Muenke (SM), Craniossinostose Não-Sindrômica (CNS), Hipocondroplasia (HCP), Acondroplasia (ACP), Síndrome Crouzonodermoesquelética (CDS), Síndrome de Crouzon (SC), Síndrome de Apert (SA), Síndrome de Pfeiffer (SP), Síndrome de Jackson-Weiss (SJW), Beare-Stevenson cutis girata (BS), Síndrome de Kallmann (SK) e Displasia Osteoglofônica (DO). A linha conectando as mutações S252L e A315S indicam mutações encontradas em pacientes com síndrome de Apert-like sem craniossinostose. (Adaptado de ORNITZ, 2005).

Das síndromes citadas, a Síndrome de Apert é a que apresenta maior risco para o desenvolvimento de retardo mental, enquanto que a de Crouzon apresenta risco elevado de hipertensão intracraniana (RENIER *et al.* 2000). Na literatura, já foram descritas algumas associações entre a síndrome de Saethre-Chotzen com o gene FGFR2 (PAZNEKAS *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2006).

O gene FGFR2 possui duas isoformas expressas em tecidos diferentes, a isoforma FGFR2b é expressa exclusivamente em células epiteliais enquanto a isoforma FGFR2c é expressa preferencialmente em células mesenquimais (ORR-URTREGER *et al.*, 1993). As duas isoformas do gene FGFR2 são criadas por *splicing* alternativo do terceiro domínio da imunoglobulina-like (D3) como mostra a figura 6.

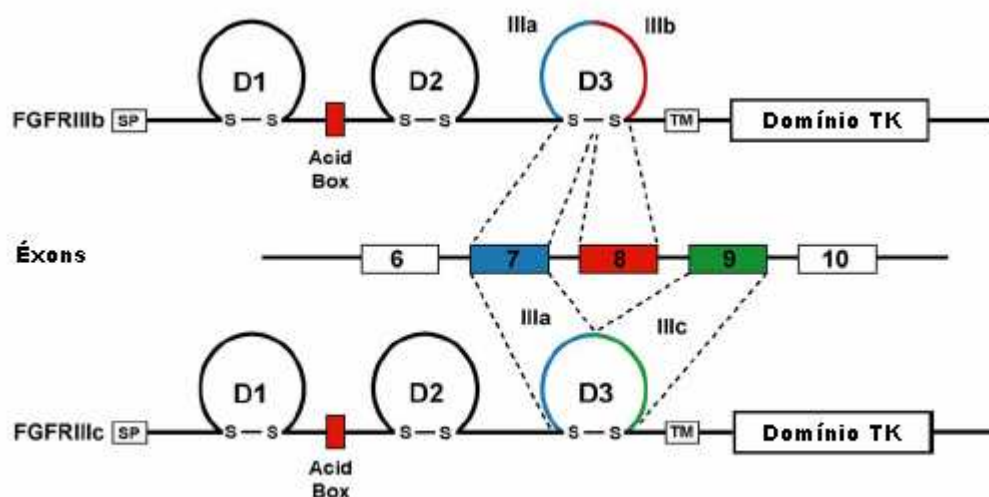


Figura 6- Isoformas variantes criadas por *splicing* alternativo dos éxons 8 e 9 do gene FGFR2. Na isoforma IIIb, o éxon 8 codifica a região C-terminal do D3. Na isoforma IIIc, o éxon 9 codifica a região C-terminal do D3 (ESWARAKUMAR *et al.*, 2005).

1.3.3- FGFR3

Alguns estudos determinaram que mutações no gene FGFR3 acarretavam diversos tipos de displasias ósseas (SHIANG et al. 1994, TAVORMINA et al., 1995; ROUSSEAU et al., 1996). A associação desse gene à essas diferentes displasias demonstraram seu amplo efeito pleiotrópico e mostraram-no, também, como um locus heterogênico para a Síndrome de Crouzon, que já havia sido anteriormente associada ao gene FGFR2. Entretanto, quando relacionada ao gene FGFR3, a síndrome de Crouzon normalmente se manifesta associada à acanthosis nigricans (MEYERS *et al.*, 1995; MULLIKEN *et al.*, 1999), uma desordem epitelial comumente relacionada à obesidade, entretanto redefinida por COHEN (1999) como Síndrome Crouzonodermoesquelética por ser resultado de uma única mutação específica e possuir em alguns casos, além de acanthosis nigricans, cementomas na mandíbula e alterações da coluna vertebral.

Em 1997, MUENKE *et al.* descreveram uma nova síndrome, distinta das outras com presença de craniossinostose, através do estudo de 61 indivíduos de vinte famílias diferentes, que apresentavam sinostose da sutura coronal e a mutação P250R. A partir dessa análise propuseram que todos os pacientes que apresentavam sinostose coronal fossem testados para essa mutação. Esta síndrome, que também apresenta outras características clínicas, tais como retardo mental, braquidactilia e diminuição da acuidade auditiva neurosensorial, recebeu o nome de Síndrome Muenke. A mutação P250R no gene FGFR3 foi encontrada em sete indivíduos, em um estudo com 31 famílias diferentes com sinais clínicos de Síndrome de Saethre-Chotzen, (PAZNEKAS *et al.*, 1998). Em 2002, CHUN *et al.* relatou a mesma mutação em 4 pacientes com o fenótipo sugestivo dessa mesma condição clínica, que classificou como síndrome de Saethre-Chotzen-like. Kress *et al.*, 2006 estabeleceu que a mutação P250R no gene FGFR3 é responsável apenas pelo fenótipo da síndrome de Muenke, enquanto que mutações no gene TWIST1 estão relacionadas à síndrome de Saethre-Chotzen.

O gene possui duas variantes de *splicing*. As isoformas 3b e 3c são expressas em diversas cartilagens da cabeça. A intensidade da expressão dessas isoformas é desigual, sendo que a isoforma 3c é fortemente expressa no tecido citado, ao contrário da isoforma 3b (RICE *et al.*, 2000).

A sobreposição de sinais clínicos e a presença de mutações nos mesmos genes que levariam a mais de uma condição com craniossinostose, tais como síndromes de Saethre-Chotzen, Crouzon e Pfeiffer, sugerem que os genes FGFRs sejam componentes da via molecular envolvida na modulação do desenvolvimento craniofacial e dos membros em humanos.

1.3.4- TWIST1

O gene TWIST1 codifica um fator de transcrição *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) associado à síndrome de Saethre-Chotzen (EL GHOUZZI *et al.*, 1999). As proteínas bHLH são constituídas por um domínio de ligação ao DNA seguido de duas α hélices conectadas por uma alça (*loop*) inter-helical de tamanho variável, importante para a manutenção da estrutura terciária da proteína. A estrutura do fator de transcrição está esquematizada na figura 7. Para ocorrer a ligação ao DNA é necessária a dimerização com a proteína, sendo esse o papel das α hélices. O fator de transcrição bHLH codificado pelo gene Twist1 pode agir como homodímero ou heterodímero, regulando positivamente ou negativamente a atividade de transcrição do gene FGFR2, respectivamente (CONNERNEY *et al.*, 2006). O gene TWIST1 possui um efeito inibitório na diferenciação tecidual na condrogênese e na miogênese (ROSE e MALCOLM, 1997).

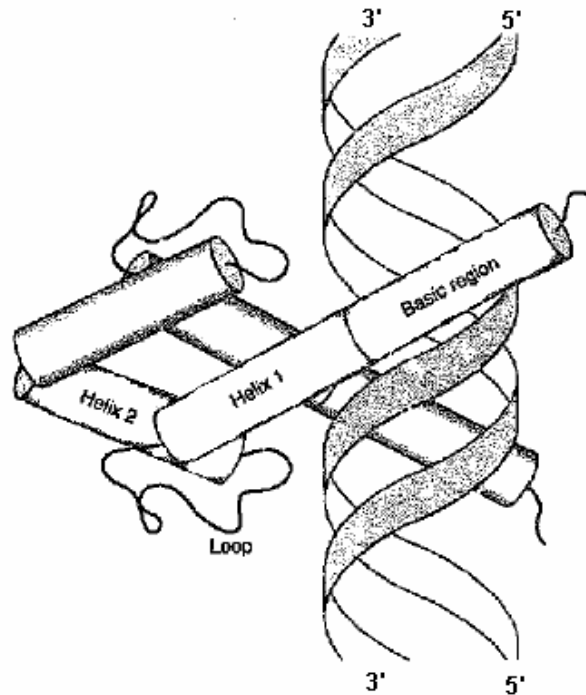


Figura 7- Esquematização da estrutura bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) dimerizada com o DNA. Adaptado de Rose e Malcolm, 1997.

Em estudos baseados em modelos animais, durante o desenvolvimento de camundongos foi observada a expressão do gene *TWIST1* em células da crista neural localizadas na região cefálica e arcos branquiais que se diferenciam futuramente em tecidos conectivos, músculo, cartilagem e osso (ISHII *et al.*, 2003; OTA *et al.*, 2004). Foram detectados também, altos níveis de expressão do gene em suturas mesenquimais e regiões osteogênicas (RICE *et al.*, 2000). Supõe-se que o gene *TWIST1* tenha um papel fundamental na especificação e manutenção da identidade celular (CUNNINGHAM *et al.*, 2007) e, no que diz respeito ao desenvolvimento de osteoblastos, o domínio *Twist-box* do *TWIST1* se liga ao domínio de ligação do gene *Runx2*, inibindo sua função de forma reversível (BIALEK *et al.*, 2004). O gene *Runx2* é um fator de transcrição ósseo que estimula a expressão de osteocalcina quando interage com receptores de vitamina D (PAREDES *et al.*, 2004). Presume-se que mutações no gene *TWIST1* possam alterar a expressão do gene *RUNX2*, resultando no fenótipo de Saethre-Chotzen (RATISOONTORN *et al.*, 2005).

A síndrome de Saethre-Chotzen (SSC) é uma condição autossômica dominante causada por diversas mutações que levam à haploinsuficiência funcional do gene TWIST1 (CUNNINGHAM *et al.*, 2007). Essa síndrome possui diversos sinais clínicos em sobreposição com a síndrome de Muenke, o que dificulta o diagnóstico clínico, portanto eram consideradas fenocópias, classificadas como síndrome de Saethre-Chotzen-like (CHUN *et al.*, 2003). Entretanto, estudos mais recentes, consideram que a síndrome de Saethre-Chotzen seja resultado de alterações no gene TWIST1, enquanto que a mutação P250R no gene FGFR3 seja responsável pela síndrome de Muenke (KRESS *et al.*, 2006). Entretanto, a literatura mostra que o fenótipo da síndrome de Saethre-Chotzen também foi associado a mutações nos genes FGFR2 e FGFR3 (PASSOS-BUENO, 1999; REARDON *et al.*, 1997; PAZNEKAS *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2006).

1.4- Investigação das craniossinostoses

Devido à diversidade clínica e molecular relacionada às síndromes de craniossinostoses (Figura 5), vários estudos foram conduzidos a fim de determinar estratégias mais eficientes e de menor custo para o diagnóstico (MUENKE e SCHELL, 1995; PAZNEKAS *et al.* 1998; KAN *et al.*, 2002).

O algoritmo proposto por CHUN *et al.* (2003) (Figura 8), é uma estratégia inicial de investigação, custo-efetiva, que busca identificar as mutações mais comuns de acordo com a suspeita diagnóstica. Esse método de investigação possui uma sensibilidade de aproximadamente 50%. A incorporação de outras técnicas investigativas, mais onerosas, podem aumentar a eficiência do diagnóstico molecular.

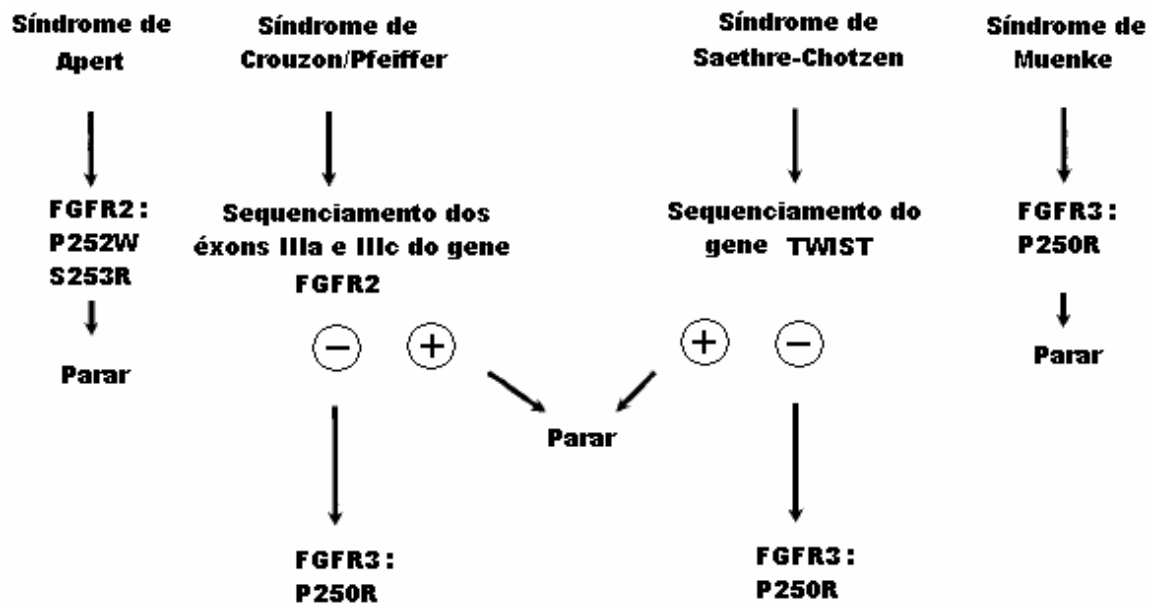


Figura 8- Algoritmo para a investigação de craniossinostoses síndrômicas. Adaptado de CHUN *et al.*, 2003.

No presente trabalho, o algoritmo proposto foi utilizado como estratégia investigativa para os indivíduos atendidos em serviço para diagnóstico e aconselhamento genético de anomalias craniofaciais.

1.5- A Mutação Q289P e sua importância

Em 2004, Nascimento *et al.* (2004) identificou uma família na qual alguns indivíduos foram clinicamente diagnosticados como portadores da síndrome de Saethre-Chotzen, entretanto nenhuma mutação no gene TWIST1 foi identificada. Em 2006, Freitas *et al.*, identificou a mutação Q289P no gene FGFR2 em dois indivíduos afetados dessa família que coincidentemente também eram os únicos que possuíam craniossinostose, sendo que esta última afetava ambas as suturas coronais.

Considerou-se a partir dessas informações que, pela expressividade variável apresentada entre os membros afetados, poderia haver valorização de sinais clínicos nos indivíduos menos acometidos, que a mutação Q289P fosse um polimorfismo não associado ao quadro clínico em questão ou ainda, que essa mutação se tratasse de uma alteração

patogênica, atuando como moduladora na via de regulação do fechamento de suturas. Suspeitou-se também que, caso a mutação fosse patogênica, esta poderia ser totalmente responsável pelo fenótipo ou que necessitaria de uma segunda ou mais mutações para se tornar deletéria.

1.6- Análise computacional

Com o auxílio da bioinformática, diversas possibilidades de análise de genes e proteínas tornaram-se possíveis. Para a análise funcional e estrutural de uma proteína são empregados algoritmos como Sorting Intolerant from Tolerant - SIFT (PAULINE e HENIKOFF, 2001; PAULINE e HENIKOFF, 2002), Polymorphism Phenotyping - PolyPhen (RAMENSKY *et al.*, 2002) e a tabela de score de Grantham (GRANTHAM, 1974). A escala de Grantham, o SIFT e o PolyPhen vêm sendo amplamente utilizados para prever quais os resultados de uma mutação na estrutura e função protéica (RUDD *et al.*, 2005; MATHE *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2007; RAJASEKARAN *et al.*, 2007). CHAN *et al.*, 2007 encontraram uma taxa significativa de concordância de 88,1% entre esses algoritmos e estudos experimentais, demonstrando, assim, que a utilização combinada desses métodos é um melhor indicador preditivo, quando comparado com o uso desses métodos isoladamente.

Trata-se, portanto, de uma estratégia recente cuja utilização em mutações relacionadas à craniossinostoses não tem sido relatada.

Apesar dos conhecimentos acumulados a respeito da gênese das craniossinostoses sindrômicas, estes ainda não foram suficientes para a elucidação completa dos mecanismos patogênicos envolvidos. A relativa raridade de cada quadro sindrômico e a dificuldade de caracterização molecular deve-se à grande quantidade de diferentes genes e mutações já identificadas e pela reconhecida complexidade da via de regulação gênica de fechamento do crânio.

Neste estudo, pretende-se investigar alguns dos aspectos da mutação Q289P do gene FGFR2 detectada por este grupo de pesquisa (FREITAS *et al.*, 2006) em uma família com sinais clínicos sugestivos da síndrome de Saethre-Chotzen.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

- 1- Contribuir para o estudo molecular das craniossinostoses.

Objetivos específicos

- 1- Sequenciar os éxons IIIa e IIIc do gene FGFR2 nos indivíduos do grupo de portadores de síndromes de craniossinostoses e na família-índice.
- 2- Investigar a mutação P252R e P250R dos genes FGFR1 e FGFR3, respectivamente, nos indivíduos do grupo de portadores de síndromes de craniossinostoses e na família-índice.
- 3- Sequenciar o gene TWIST1 nos indivíduos do grupo de portadores de síndromes de craniossinostoses.
- 4- Investigar a presença da mutação Q289P do gene FGFR2 em indivíduos normais da população brasileira.
- 5- Investigar a presença da mutação Q289P do gene FGFR2 em indivíduos com craniossinostoses síndrômicas.
- 6- Avaliar a interferência da mutação na estrutura e/ou função da proteína utilizando os algoritmos *in silico* SIFT, PolyPhen e a escala de Grantham.

3- CAPÍTULO

Neste Capítulo serão apresentados, no idioma de veiculação, os resultados deste estudo sob a forma de artigo, intitulado *Analysis of the Q289P mutation in the FGFR2 gene: Population and computational studies*, submetido para publicação no The Clef Palate-Craniofacial Journal.

Os resultados correspondentes aos objetivos específicos 3 e 4, utilizados como suporte na redação do artigo acima citado, encontram-se no anexo 1.

**Analysis of the Q289P mutation in the FGFR2 gene:
Population and computational studies**

Authors: Bernardo Lamartine Nogueira Passarinho; Érika Lopes Freitas, M.S;
Vera Lúcia Gil-da-Silva Lopes, M.D., Ph.D.

Institutional affiliation: Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências
Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Address correspondence to:

Dra.Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes, Departamento de Genética Médica-FCM,
Universidade Estadual de Campinas, 6111, C.E.P. 13083-970 Campinas, SP, Brasil.

Phone: # 55-19-3521-8904

FAX: # 55-19-3521-8909

Email: vlopes@fcm.unicamp.br

Grant support: FAEPEX / UNICAMP and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (CAPES).

3.1- Abstract

OBJECTIVES: The aims of this study were to verify the prevalence of the Q289P mutation in FGFR2 gene in different groups and to simulate the effects of this mutation by computational analyses. The Q289P mutation in FGFR2 gene was identified in some members of a family with clinical features of Saethre-Chotzen syndrome. Considering the variable expressiveness of this condition, as well as in this specific family some hypotheses were suggested: the mutation could generate a modified regulatory protein of skull sutures closure, or the mutation could be a low frequency polymorphism or it could be completely responsible for the Saethre-Chotzen features found in the affected members of the family. **METHODS:** Three different groups were investigated: 40 individuals with syndromic craniosynostosis, 200 normal controls and all members clinically evaluated from mentioned family. This investigation also includes the search for mutations in hotspots in all individuals with craniosynostosis. Computational approaches were applied to simulate the effects of the mutation on the protein and predict its deleterious potential. **RESULTS:** Except for the patients in whom the Q289P mutation was previously detected, no other cases were identified. Simulated computational approaches indicated a deleterious potential. **CONCLUSIONS:** We suggested that the Q289P mutation in FGFR2 gene is deleterious, rare and associated with craniosynostosis phenotype only and not strongly related to facial and neurological phenotype.

Key words: Craniosynostosis; Saethre-Chotzen; FGFR2; SIFT; PolyPhen; Grantham

3.2- Introduction

Since the FGFR2 gene description in humans (HOUSSAINT *et al.*, 1990) and its first correlations with craniosynostosis syndromes (REARDON *et al.*, 1994; JABS *et al.*, 1994, WILKIE *et al.*, 1995; LAJEUNE *et al.*, 1995), more than 80 mutations have been described in this gene, including point mutations, deletions and insertions (Human Genome Mutant Database, 2008). The majority of these mutations occur in IIIa and IIIc exons (KAN *et al.*, 2002).

The FGFR2 gene has two isoforms expressed in different tissues. The FGFR2b (IIIb) isoform is exclusively expressed in epithelial cells while the FGFR2c (IIIc) isoform is preferentially expressed in mesenchymal cells (ORR-URTREGER *et al.*, 1993). The skeletal system originates from mesodermal cells and neural crest. The mesenchymal cells have the ability to differentiate into varied types of cells, such as osteoblasts, fibroblasts and chondroblasts (MOORE and PERSAUD, 2000).

The Q289P mutation in FGFR2 gene has been associated with Crouzon, Jackson-Weiss and Saethre-Chotzen syndromes (GORRY *et al.*, 1995; OLDRIDGE *et al.*, 1995; MEYERS *et al.*, 1996; NASCIMENTO *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006). This substitution is located in the IIIa protein ligation-binding codifying region of the Ig-like III domain.

In spite of the mutation being related to the clinical conditions cited above, a study in 2006 (FREITAS *et al.*, 2006), described this mutation only in 2 members of a family constituted of 23 individuals with variable clinical expression of the Saethre-Chotzen syndrome. The patients in which the mutation was detected were the only ones presenting bicoronal craniosynostosis (III-1 to IV-2). A second degree relative (IV-5) presented mild facial dismorfism and mental deficiency without sinostotic involvement. This mutation was not observed in 11 other patients of this family in which the Saethre-Chotzen diagnostic was suspected (Figure 9).

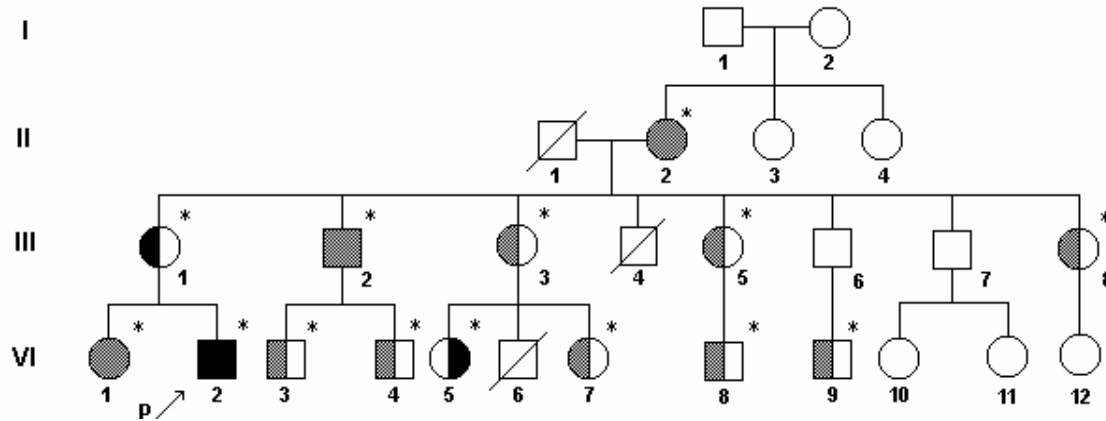


Figure 9- Family pedigree

P indicates the proband. * indicates examined individuals. ■ patient diagnosed with Saethre-Chotzen presenting mental retardation and bicoronal craniosynostosis; ● patient diagnosed with Saethre-Chotzen and presenting bicoronal craniosynostosis; ● patient diagnosed with Saethre-Chotzen and presenting mental retardation; ■● patients diagnosed with Saethre-Chotzen; ■● patients presenting two or more Saethre-Chotzen features. Adapted from Nascimento et al., 2004.

Some hypotheses were proposed to explain those findings. The mutation Q289P could be a nondeleterious low-frequency polymorphism not related to craniosynostosis, a deleterious mutation responsible for the craniosynostotic phenotype or act as a modifying element in the signaling pathway for skull suture closure when associated with a specific haplotype or other mutations.

Nowadays, it is possible to predict the effect of amino acids substitutions on the protein using more precise algorithms. The Grantham matrix scoring system (GRANTHAM, 1974), based on the physical-chemical differences among polarity, molecular composition and molecular volume, can predict the effect of amino acids substitutions. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) program is based on the BLOSUM62 matrix. The SIFT aligns the query sequence using NCBI's PSI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) with related paralogous and/or orthologous sequences that may share similar function, identifying tolerated and not tolerated substitutions, at conservation

levels, of each single amino acid position of the protein (NG and HENIKOFF, 2001). Polyphen - Polymorphism Phenotyping (RAMENSKY *et al.*, 2002) is capable of predicting the result of the amino acid switch based on its conservation through evolution, position into functional or structural domains on the protein and physical-chemical properties of the amino acids.

The aims of this study were to determine the frequency of Q289P mutation in a sample of normal population and in a group of non-related syndromic craniosynostosis individuals and to verify the effects of this mutation on the protein by computational analysis.

3.3- Methods

This study was conducted at the Teaching Hospital of the State University of Campinas. It was approved by the Research Ethics Committee of the FCM-Unicamp (process number 488/2002, CONEP 7016). The participation of the patients in this study was confirmed by signature of a free and clarified consent term by the patients or their parents.

3.3.1- Population analysis

Three different groups have been studied. The group one consisted of syndromic craniosynostosis individuals, the group two represented a sample of the population for control purposes, and the third group was composed by the 23 members of the family first described by Nascimento *et al.* (2004) for further investigations.

In group one 40 non-related patients have been studied, of whom 20 were clinically diagnosed with Saethre-Chotzen, 4 with Pfeiffer, 5 with Crouzon and 1 with Apert syndrome and 10 patients had nonconclusive clinical diagnosis. All those patients were examined by an experienced clinical geneticist and also underwent molecular test according to the Chun's algorithm (CHUN *et al.*, 2003) based on the suspected clinical

diagnosis. The group two was composed by 200 individuals from the normal population, with a 1M: 1F sex ratio. The 23 family members analyzed represented the third group, who were first tested for the TWIST1 gene by Nascimento *et al.* (2004) and then for the mutation Q289P by Freitas *et al.* (2006).

PCR and digestion with the BsaJ I enzyme were performed in groups one and two for Q289P identification. The BsaJ I enzyme recognized the C/CNNGG sequence resulting in enzymatic cleavage. In an agarosis gel, individuals without the mutation exhibited only one fragment with 325 pb after digestion, while heterozygous carriers for the mutation showed two indistinguishable fragments with 168pb and 157pb, plus the 325pb fragment after electrophoresis. All members of the third group had their IIIa and IIIc FGFR2 exons sequenced using primers previously described by Kan *et al.* (2002), and were also tested for P252R and P250R hotspots in FGFR1 and FGFR3 genes, respectively.

3.3.2- Bioinformatic analysis

The purpose of the computational analysis was to simulate the Q289P mutation in the FGFR2 isoform IIIc. The Grantham matrix score classifies the substitutions into classes as conservative (0-50), moderately conservative (51-100), moderately radical (101-150) or radical (higher than 151), according to the chemical differences of the amino acids (LI *et al.*, 1984).

Ng e Henikoff (2001) and Xi *et al.* (2004) classified the SIFT scores as intolerant (0.0-0.05), potentially intolerant (0.051-0.10), borderline (0.101-0.20) or tolerant (0.201-1.00).

The PolyPhen PSIC scores are designated as benign (0.00-0.99), borderline (1.00-1.24), potentially damaging (1.25-1.49), possibly damaging (1.50-1.99) or probably damaging (higher than 2.00) according to Xi *et al.* (2004).

3.4- Results

3.4.1- Investigation of the Q289P frequency in the FGFR2 gene

The FGFR2 Q289P mutation in exon IIIa was not detected in groups one and two (Figure 10).

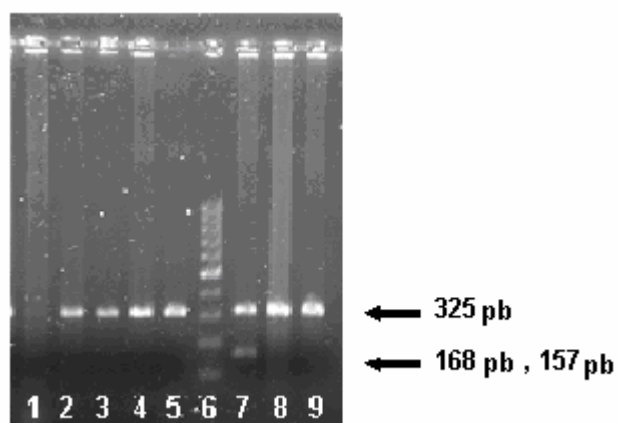


Figure 10- Electrophoresis of the Q289P mutation digestion in agarosis gel.

Lane 1- negative control; Lanes 2 to 5- Group two individuals with no cleavage by the BsaJ I enzyme resulting in only one fragment with 325pb; Lane 6- 100pb ladder; Lane 7- Proband from group three who presented the Q289P mutation resulting in three different fragments with 325pb, 168pb and 157pb after BsaJ I restriction enzyme cleavage; Lanes 8 and 9- Group one patients with no cleavage by the BsaJ I enzyme resulting in only one fragment with 325pb.

In group one, thirteen different mutations were identified: three mutations for Saethre-Chotzen syndrome, six for Crouzon syndrome, three for Pfeiffer syndrome, and one for Apert syndrome. The three mutations identified in TWIST1 gene were not previously described in known databases.

3.4.2- Complementary investigation of the studied family

The Q289P mutation was previously detected by Freitas *et al.*, (2006) in the family studied in members III-1 and IV-2 only. Other mutations, investigated in the present study, in genes FGFR1, FGFR2 and FGFR3 were not identified. The isoform IIIc sequence was obtained from the NCBI human RefSeq. The isoform FGFR2c accession code is NP-000132.1.

3.4.3- Computational analyses

A 76 score obtained using Grantham matrix indicated a moderately conservative substitution, the result of physical-chemical dissimilarities between a glutamine and a proline.

It was obtained a SIFT obtained a score of 0.00 for the Q289P mutation in FGFR2c variant, indicating an intolerant substitution which affects the protein function. 88 similar sequences were compared and a 3.09 median sequence conservation was obtained.

Differences among amino acids substituted in the structure of the protein were analyzed by PolyPhen. The algorithm predicted that the mutation would lead to a disruption in the ligand-binding site, based on a 2.486 PSIC score and 99 observations. A PSIC score higher than 2.00 shows that the mutation is probably damaging.

3.5- Discussion

Molecular studies about craniosynostosis are usually complicated by its complex signaling pathways, its various molecular interactions and modulation of genes involved (ESAWARAKUMAR *et al.*, 2005; ORNITZ, 2005). Therefore, these types of analysis should be taken with caution in order to investigate all possible interferences in expression and regulation of these pathways.

Although the ideal amount of control samples necessary to detect a polymorphism, considering its population frequency of 5%, 1% and 0.1%, has been suggested by Collins and Schwartz (2002), the Q289P mutation does not have a defined population frequency. Therefore, the sample of individuals obtained for our analysis was ascertained empirically, considering a population five times higher than the population in our syndromic craniosynostosis group. The group one comprised 50% males and 50% females, and although syndromic craniosynostosis is not directly related to sexual characteristics, some events are more frequent in one sexual class than the other. Sagittal sutures are more common in males, while coronal sutures are more common in females (COHEN, 2005).

Despite the sample size the absence of the mutation Q289P in normal population, lead us to suppose that it is not a neutral polymorphism. As well, considering the few reports of this mutation in syndromic craniosynostosis, it indicates that the mutation seems to be rare but, somehow, associated with these conditions.

Considering that the mutation may be responsible for significant phenotypic alterations, evolutive forces can act against this specific genotype, so that the allele tends to become more rarer. Henceforth, the expressiveness of the phenotype in Saethre-Chotzen syndrome, as much as in other craniosynostosis syndromes, is highly variable (COHEN and MACLEAN, 1999). For example, in a study of a New Zealand non-syndromic craniosynostosis affected family (MOKO and BLANDIN DE CHALAIN, 2001), three patients had left coronal synostosis, one had right coronal synostosis and one had bilateral coronal synostosis, and all of them were heterozygous for the P250R mutation in FGFR3 gene. The variable expression in those syndromes decreased the selective pressure over the mutated allele, not allowing its complete disappearance.

Only patients III-1 and IV-2 (proband) of the group three presented the Q289P mutation in exon IIIa of the FGFR2 gene. The central point in the discussion of this family comes from the fact that the patient IV-5 had facial dysmorphisms compatible with Saethre-Chotzen syndrome and, as the proband, mild mental retardation, but without the Q289P mutation. The patient IV-1 had a phenotype that resembled Saethre-Chotzen dysmorphisms but without mutation, mental retardation or craniosynostosis.

However, some of the facial dysmorphisms may have been overestimated during clinical evaluation. The clinical and molecular analysis of the four patients III-1, IV-1, IV-2 and IV-5, suggested that the Q289P mutation is not related to the facial and neurological phenotype but is strongly correlated with craniosynostosis. The cranial suture phenotype may need a second (two-hit) or more (multi-hit) mutations to change its normal development, in which the Q289P acts as modulation factor over the signaling pathway.

The P252R mutation hotspot in FGFR1 and P250R in FGFR3 gene and exons IIIa and IIIc of the FGFR2 gene were investigated in group three. No additional mutations were found in this family. However, the hypothesis that another mutation may be responsible for the facial and neurological phenotype should not be discarded. The signaling pathway is diverse and many other signaling molecules and transcriptional factors should be analyzed.

In all patients from group one, which the molecular analyses detected a mutation, no secondary mutations were found. The overall detection rate of this group using only using PCR followed by sequencing was 32,5%. The method used in this study can detect only point mutations and small deletions or insertions. Different types of mutations as large deletions, transversions or insertions might also be responsible for the clinical picture. Ten patients included had several dysmorphic features including craniosynostosis, but they had not a conclusive clinical entity. This fact might have been responsible for the low tax of mutations detected in this group.

Isoform FGFR2c was believed to be expressed only in mesenchymal cells, however, some studies revealed the expression of this isoform in epithelial tissues (ALIZADEH *et al.*, 2003; DRUGAN *et al.*, 1998; STEELE *et al.*, 2001; CHAFFER *et al.*, 2006). The isoform FGFR2b is expressed only in epithelial cell tissues (ORR-URTREGER *et al.*, 1993). Alterations in mesenchymal and neural crest cells are responsible for craniofacial dysmorphism and epithelial tissues are not involved (SPERBER, 2001).

The isoform FGFR2c has ligation specificity for the FGFs 1, 2, 4, 6, 9, 17 and 18 (ESWARAKUMAR *et al.*, 2005). In targeted disruption studies in FGFs (Fibroblast growth factors), FGF2 expresses alterations in neural, skeletal and skin

phenotypes (DONO *et al.*, 1998). Disruption in FGF18 is related to delayed ossification and increased chondrocyte proliferation (LIU *et al.*, 2002; OHBAYASHI *et al.*, 2002). These FGFs must be more closely involved in the craniosynostosis phenotype, as well as the FGF8 which is related to many different phenotypes including craniofacial development and it has ligation specificity for FGFR3c and FGFR4 (ORNITZ, 2005; XU *et al.*, 2000; MEYERS *et al.*, 1998). Increased presence of FGF2 has been demonstrated to be associated with both normal (MOST *et al.*, 1998) and induced (ISEKI *et al.*, 1997) suture closures.

The pathogenetic mechanism is still not clear. Some mechanisms of premature suture closures involve the loss or addition of a cysteine residue, facilitating the formation of disulfide bonds that leads to dimerization, phosphorylation and independent signal ligation (MUNKE and SCHELL, 1995; GALVIN *et al.*, 1996). Another mechanism elucidated by Yu *et al.*, (2000) suggests that more frequent Apert mutations S252W and P253R lead to loss of FGFR2 isoform specificity for their ligands, allowing the mesenchymal FGFR2c variant to be activated by FGF7 and FGF10, which are FGFR2b specific, generating autocrine signaling in non-specific tissues.

Grantham matrix, SIFT and PolyPhen are being widely used in computational analysis to predict the impact of non-synonymous mutations on the structure and function of proteins (RUDD *et al.*, 2005; MATHE *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2007; RAJASEKARAN *et al.*, 2007). Comparative analysis among these algorithms shows a positive concordance for the predictions made (XI *et al.*, 2004). Chan *et al.*, (2007) also reported a significant concordance ratio of 88.1% among these methods, indicating that the combined use of these algorithms have a better prediction effect, instead of using one method alone.

Grantham matrix showed a 76 score for the Q289P mutation, indicating a moderate conservative substitution. The divergence of the polar glutamine and the hydrophobic proline may decrease ligand-binding affinity by damaging the normal folding process of the protein (KYTE and DOOLITTLE, 1982). The SIFT score of 0.00 with a median sequence conservation of 3.09 and 88 sequences represented at this position indicates that the mutation is deleterious and affected protein function. The median sequence conservation, obtained by measuring the information in the sequence

patterns at binding sites (SCHNEIDER *et al.*, 1986), higher than 3.25 especially those greater than 3.5, should be taken with caution, because this value indicates that the substitution is in a position that has not had enough time to evolve and is conserved by chance, considering that the prediction was based on closely related sequences (NG and HENIKOFF, 2001). PolyPhen also predicted that the Q289P mutation was deleterious and resulted in disruption of the ligand-binding site, with a PSIC score of 2.486. The result obtained by the three algorithms was concordant. Computational and population analysis and clinical findings in the family described by Nascimento *et al.* (2004) support the supposition that the Q289P mutation in FGFR2 gene may be a deleterious substitution with gain of function, resulting in disruption of the ligand-binding site of the protein. In addition, Q289P mutation seems to be responsible for the cranial sutures phenotype and not directly involved in facial and neurological phenotype.

The computational analyses were able to predict the deleterious effect of Q289P mutation in IIIc isoform of FGFR2 gene. Considering that this kind of investigation is not conclusive, experimental studies of this and others participating genes of the sutures closure signaling pathway may help to better understand the functions and mechanisms involved in the development of the syndromic craniosynostosis phenotype.

3.6- Conclusions

The absence of Q289P mutation in non-affected population indicates that this mutation might not be a neutral polymorphism. This idea is supported by the computational studies applied in this work. These computational algorithms are only for prediction purposes, so experimental analysis of the mutated protein should be carried out to confirm the consequences generated by the substitution in the FGR2 gene.

Studies in the third group suggested a strong correlation between the mutation Q289P and coronal bilateral craniosynostosis, and a weak correlation of the mutation with facial and neurological phenotype. The molecular investigation of the other genes in this family showed absence of a secondary mutation in the common regions of these genes that

occasionally leads to syndromic craniosynostosis when mutated, so further investigations of other regions of those genes, other genes in this signaling pathway or other genes of different signaling pathways can lead to a better understanding of the function and regulation of the molecular mechanisms of suture closures.

We believe that these results could contribute for a better understanding of the complex signaling pathway of sutures closure.

3.7- References

Alphey L. DNA sequencing - From experimental methods to bioinformatics, Ed. BIOS scientific publisher, 1997

Alizadeh M, Miyamura N, Handa JT, *et al.* Human RPE cells express the FGFR2IIIc and FGFR3IIIc splice variants and FGF9 as a potential high affinity ligand. *Exp Eye Res* 2003; 76:249-56.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389 - 402.

Barroso J, Gurnell M, Croeley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, *et al.*, Dominant negative mutations in human PPAR gamma associated with severe insulin resistance diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402:880-883.

Berman HM, Westbrook J, Gilliland G, Feng Z, *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(1):235-42.

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane C, Lim EP, Kalyanaraman N, *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22:231-238.

Chaffer LC, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Research* 2006; 66: 11271-11278, December 1,

Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP, Raevaara T, Ollila S, Nyström M, Grimm AJ, Christodoulou J, Oetting WS, Greenblatt MS. Interpreting Missense Variants: Comparing Computational Methods in Human Disease Genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and Tyrosinase (TYR). *Human Mutation* 2007; 28(7), 683-693

Chun K, Teebi AS, Azimi C, Steele L, Peter N. RayScreening of patients with craniosynostosis: Molecular strategy. *Am J Med Genet* 2003; 120A:470-473.

Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, *et al.* Fibroblast growth factor receptor FGFR 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem* 1994; 269:11620-7

Cohen Jr MM. *Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Surgery*. New York: Ed. Raven Press, 1986

Cohen Jr MM, Maclean RE. Should syndromes be defined phenotypically or molecularly? Resolution of the dilemma. *Am J Med Genet* 1999; 86:203-204.

Cohen Jr MM. Editorial: Perspectives on Craniosynostosis. *Am J Med Genet* 2005; 136A:313-326

Collins JS, Schwartz CE. Detecting polymorphisms and mutations in candidate genes. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1251-1252.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J* 1998; 17:4213-25.

Drugan CS, Paterson IC, Prime SS. Fibroblast growth factor receptor expression reflects cellular differentiation in human oral squamous carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 1998; 19:1153-6.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2005; 16:139-149

Freitas EC, Nascimento SR, de Mello MP, Gil-da-Silva-Lopes VL. Q289P mutation in FGFR2 gene causes Saethre-Chotzen syndrome: some considerations about familial heterogeneity. *Cleft Palate Craniofac J* 2006; 43(2):142-7.

Galvin BD, Hart KC, Meyer AN, Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7894-7899

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185:862-4.

Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Singhal VK, Losken HW, Ehrlich GD, *et al.* Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1387-1390.

Henrick K , Thornton JM. PQS: Protein quaternary structure file server. *Trends Biochem Sci* 1998; 23(9):358-61.

Houssaint E, Blanquet PR, Champion-Arnaud P, Gesnel MC, Torriglia A, Courtois Y, Breathnach R. Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. *Proc Nat Acad Sci* 1990; 87: 8180-8184.

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Jabs EW, *et al.* Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 1997; 15:36-41.

Human Genome Mutation Database. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Accessed January 30, 2008.

Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* 1998; 273, 13230-13235.

Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morriss-Kay GM. Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development* 1997; 124:3375-3384.

Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao J, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet* 1994; 8: 275-279.

Jin ZB, Gu F, Matsuda H, Yukawa N, Ma X, Nao-i N. Somatic and gonadal mosaicism in X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet Part A*. 2007; 143(21):2544-8

Kaminsky ZA, Assadzadeh A, Flanagan J, Petronis A. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e 95.

Kan S, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich E W, Tomkins S, Verloes A, Twigg SRF, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AOM. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 472-486.

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157:105-132.

Lajeunie E, Ma HW, Bonaventure J, Munnich A, Le Merrer M, Renier D. FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet* 1995; 9:108.

Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol* 1984; 21:58-71.

Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 2002; 16:859-69.

Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Research*, 2006; 34(5): 1317-1325

Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ, Graham Jr JM, Feingold M, Moeschler JB, Rawnsley E, Scott AF, Jabs EW. 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* 1996; 58: 491-498.

Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 1998; 18:136-41.

Moko SB, Blandin de Chalain TM. New Zealand Maori family with the pro250arg fibroblast growth factor receptor 3 mutation associated with craniosynostosis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2001; 29(1):22-4.

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

Most D, Levine JP, Chang J, Sung J, McCarthy JG, Schendel SA, Longaker MT. 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* 1998; 101:1431-1440.

Nascimento SR, de Mello MP, Batista JC, Balarin MA, Lopes VL. Clinical findings in four Brazilian families affected by Saethre-Chotzen syndrome without TWIST mutations. *Cleft Palate Craniofac J* 2004; 41:250-255.

Ng PC and Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001; 11: 863-874.

Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, *et al*. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 2002; 16:870-9.

Oldridge M, Wilkie AOM, Slaney SF, Poole MD, Pulleyn LJ, Rutland P, Hockley AD, Wake MJC, Goldin JH, Winter RM, Reardon W, Malcolm S. Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1077-1082, 1995.

Oldridge M, Lunt PW, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Muenke M, Moloney DM, Twigg SRF, Heath JK, Howard TD, Hoganson G, Gagnon DM, Jabs EW, Wilkie AOM. Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the IgII-IgIII linker of FGFR2. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 137-143.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 1996; 271, 15292-15297.

Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2005; 16:205-213

Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, *et al.* Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol* 1993; 158:475-86.

Rajasekaran R, Sudandiradoss C, Doss CGP, Sethumadhavan R. Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene. *Genomics* 2007; 90:447-452

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:3894-900.

Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nature Genet* 1994; 8: 98-103.

Rudd MF, Williams RD, Webb EL, Schmidt S, Sellick GS, Houlston RS. The Predicted Impact of Coding Single Nucleotide Polymorphisms Database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11).

Schneider TD, Stormo GD, Gold L, Ehrenfeucht A. Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* 1986; 188(3):415-31.

Sperber GH, Craniofacial development Hamilton: BC Decker Inc; 2001

Steele IA, Edmondson RJ, Bulmer JN, *et al.* Induction of FGF receptor 2-IIIb expression and response to its ligands in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2001; 20:5878-87

Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov IV, *et al.* PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Eng* 1999; 12(5):387-94

Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet* 2000; 16:198-200

Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methylsingle nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 2002; 23:4072-4079.

Wilkie AOM, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, Malcolm S, Winter RM, Reardon W. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature Genet* 1995; 9:165-172.

Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics* 2004; 83:970-9.

Xu J, Liu Z, Ornitz DM. Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 2000; 127:1833-43.

Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand binding specificity in Apert syndrome. *PNAS* 2000; 97(26):14536-14541

Zlotogora J. Germ line mosaicism. *Hum Genet* 1998; 102: 381-386.

4- DISCUSSÃO GERAL

As síndromes de craniossinostoses são um grupo de doenças que têm seu estudo dificultado devido à complexidade das vias de regulação dos genes envolvidos e da extensa variabilidade fenotípica entre os indivíduos afetados como foi apresentado. O diagnóstico clínico, em diversos casos, depende de investigação molecular que nem sempre é capaz de identificar a mutação responsável pela alteração fenotípica (PAZNEKAS *et al.*, 1998; KRESS *et al.*, 2006).

O aprofundamento do estudo molecular da família inicialmente investigada por NASCIMENTO *et al.*, 2004 e FREITAS *et al.*, 2006 cujos membros apresentam fenótipo clínico da síndrome de Saethre-Chotzen, pôde sugerir que a mutação Q289P esteja fortemente relacionada ao fenótipo craniano e fracamente relacionada ao fenótipo neurológico e facial.

A análise computacional pôde prever o efeito decorrente da substituição Q289P na isoforma IIIc do gene FGFR2, demonstrando ser uma mutação de potencial deletério, entretanto esse tipo de estudo não é conclusivo. Deste modo, apenas a investigação protéica experimental deste e de outros genes participantes da via de regulação da formação normal do crânio poderá elucidar essas suposições apresentadas, clareando assim a função e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do fenótipo sindrômico das craniossinostoses.

5- CONCLUSÃO GERAL

Considerando os objetivos propostos:

- 1- Não foram detectados indivíduos normais com a mutação Q289P, indicando que este não deve ser um polimorfismo neutro;
- 2- A mutação Q289P não foi detectada em indivíduos portadores de craniossinostoses síndrômicas, sugerindo que esta, se ocorrer neste grupo, deve ter baixa frequência.
- 3- A investigação dos éxons IIIa e IIIc do gene FGFR2 detectou 2 mutações relacionadas à síndrome de Pfeiffer, 3 mutações relacionadas à Síndrome de Crouzon e 1 mutação relacionada à Síndrome de Apert no grupo de indivíduos portadores de craniossinostoses síndrômicas. Nesse mesmo grupo, a investigação do gene TWIST1 detectou três mutações relacionadas ao fenótipo da síndrome de Saethre-Chotzen.
- 4- Considerando os casos da família-índice em que foi encontrada a mutação Q289P do gene FGFR2, a não detecção de outras mutações em *hot spots* dos genes FGFR1 e 3 e nos éxons IIIa e IIIc, reduz consideravelmente a possibilidade de que esta mutação seja secundária e atue como moduladora. Entretanto, isto não exclui a ocorrência de uma segunda mutação em outras regiões dos genes estudados, em outros genes da via de regulação estudada ou outros genes de vias de regulação diferentes. Esta hipótese é suportada, também, pela ausência desta mutação nos indivíduos com craniossinostoses síndrômicas.
- 5- As análises computacionais realizadas pelos algoritmos *in silico* SIFT e PolyPhen e de acordo com a matriz de Grantham conseguiram prever que a mutação Q289P é patogênica por alterar a estrutura dos sítios de ligação da proteína.
- 6- Os dados clínicos e moleculares deste estudo sugerem que a mutação Q289P do gene FGFR2 parece estar fortemente relacionada à presença de craniossinostose, tendo fraca correlação com as demais características fenotípicas da síndrome de Saethre-Chotzen e deficiência mental.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuisson J, Pêcheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, Dodé C, *et al.* Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat* 2005; 25(1):98-9.

Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992; 59:115-65.

Bellus GA., Hefferon TW, Ortiz De Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M. *et al.* Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 368-373.

Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 2004; 6:423-35.

Bonaventure J, El Ghouzzi V. Molecular and cellular bases of syndromic craniosynostoses. *Expert Reviews* 2003; 5.

Chun K, Teebi AS, Azimi C, Steele L, Ray PN. Screening of patients with craniosynostosis: Molecular strategy. *Am J Med Genet* 2002; 120A (4):470-473.

Chun K, Teebi AS, Jung JH, Kennedy S, Laframboise R, Meschino WS, Nakabayashi K, Scherer SW, Ray PN, Teshima I. Genetic analysis of patients with the Saethre-Chotzen phenotype. *Am J Med Genet A.* 2003; 121(2):188-9.

Cohen MM Jr. Craniosynostosis. *Am J Med Genet Suppl* 1986; 4:99-148.

Cohen MM Jr, Kreiborg S. Birth prevalence studies of the Crouzon syndrome: Comparison of direct and indirect methods. *Clin Genet* 1992; 41: 12-15.

Cohen MM Jr. Let's call it "Crouzonodermoskeletal syndrome" so we won't be prisoners of our own conventional terminology. *Am J Med Genet* 1999; 84(1): 74.

Cohen MM Jr. Cloverleaf skull. In: Cohen MM Jr, MacLean RE. *Craniosynostosis: Diagnosis, evaluation, and management.* Raven, New York: Oxford University Press 2000; pp 309-312.

Collins JS, Schwartz CE. Detecting polymorphisms and mutations in candidate genes. *Am J Hum Genet* 2002; 71(5):1251-2.

Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 Dimer Selection Regulates Cranial Suture Patterning and Fusion. *Developmental Dynamics* 2006; 235:1345-1357.

Cornejo-Roldan LR, Roessler E, Muenke M. Analysis of the mutational spectrum of the FGFR2 gene in Pfeiffer syndrome. *Hum Genet.* 1999; 104(5):425-31.

Cunningham ML, Seto ML, Ratisoontorn C, Heike CL, Hing AV. Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 67-81.

Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, *et al.* Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003; 33(4):463-5.

El Ghouzzi V, Lajeunie E, Le Merrer M, Cormier-Daire V, Renier D, Munnich A, Bonaventure J. 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* 1999; 7:27–33.

Freitas EL. Estudo de craniossinostoses por meio de investigação de regiões genômicas específicas. [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Freitas EL, Nascimento SRD, De Mello MP, Gil-da-Silva-Lopes VL: Saethre-Chotzen syndrome caused by Q289P mutation in FGFR2 gene and some considerations about familial heterogeneity. *Cleft Palate Craniofac J* 2006; 43(2):142-147.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5(6):623-628.

Goriely A, McVean GAT, Rojmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AOM. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Science* 2003; 301: 643- 646.

Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Singhal VK, Losken HW, Parker MG, Nwokoro NA, Post JC, Ehrlich GD. Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1387-1390.

Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Dev Biol* 2006; 20(6):7.

Gripp KW, Stolle CA, McDonald-McGinn DM, Markowitz RI, Bartlett SP, Katowitz JA, Muenke M, Zackai EH. Phenotype of the fibroblast growth factor receptor 2 ser351-to-cys mutation: Pfeiffer syndrome type III. *Am J Med Genet* 1998; 78:356-360.

Gripp KW, Stolle CA, Celle L, McDonald-McGinn DM, Whitaker LA, Zackai EH. TWIST gene mutation in a patient with radial aplasia and craniosynostosis: further evidence for heterogeneity of Baller-Gerold syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 82(2): 170-6.

Ingersoll RG, Paznekas WA, Tran AK, Scott AF, Jiang G, Jabs EW: Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 94(3-4):121-6.

Ishii M, Merrill AE, Chan YS, Gitelman I, Rice DP, Sucov HM *et al.* Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* 2003; 130:6131-42.

Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao J, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet* 1994; 8: 275-279.

Kan S, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW. *et al.* Genomic screening of Fibroblast Growth-Factor Receptor 2 reveals a wide spectrum of mutation in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J med Genet* 2002; 70:472-486.

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* 2000; 91(1-4):138-40.

Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, Reinhart E, Schafer WD, Sold J, Hoppe F, Pahnke J, Trusen A, Sorensen N, Krauss J, Collmann H. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14(1):39-48.

Lajeunie E, Ma HW, Bonaventure J, Munnich A, Le Merrer M, Renier D. FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. (Letter) *Nature Genet* 1995; 9: 108.

Lajeunie E, Heuertz S, El Ghouzzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, Bonaventure J. Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(3):289-98.

Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet* 1995; 11:462-4.

Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ, Graham JM Jr, Feingold M, Moeschler JB, Rawnsley E, Scott AF, Jabs EW. 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* 1996; 58:491-498.

Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, *et al*. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:246-50.

Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, *et al*. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet* 1994; 8: 269-274.

Muenke M, Schell U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 1995; 11(8):308-313.

Muenke M, Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, *et al.* A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 60:555-564.

Muller U, Warman ML, Mulliken JB, Weber JL. Assignment of a gene locus involved in craniosynostosis to chromosome 5qter. *Hum Molec Genet* 1993; 2:119-122.

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

Mulliken JB, Steinberger D, Kunze S, Muller U. Molecular diagnosis of bilateral coronal synostosis. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104:1603-15.

Okajima K, Robinson L K, Hart MA, Abuelo DN, Cowan LS, Hasegawa T, Maumenee IH, Jabs EW. Ocular anterior chamber dysgenesis in craniosynostosis syndromes with a fibroblast growth factor receptor 2 mutation. *Am J Med Genet* 1999; 85: 160-170.

Oldridge M, Wilkie AOM, Slaney SF, Poole MD, Pulleyn LJ, Rutland P, Hockley AD, Wake MJC, Goldin JH, Winter RM, Reardon W, Malcolm S. Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1077-1082.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:191-220.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {101200}: {acesso em 20 Out. 2007}: Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {123500}: {acesso em 20 Out. 2007}: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {101600}: {Acesso em 20 Out. 2007}: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {101400}: {Acesso em 20 Out. 2007}: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {123150}: {Acesso em 20 Out. 2007}: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Opperman, L.A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn* 2000; 219(4):472-85.

Ota MS, Loebel DA, O'Rourke MP, Wong N, Tsoi B, Tam PP. Twist is required for patterning the cranial nerves and maintaining the viability of mesodermal cells. *Dev Dyn* 2004; 230:216–28.

Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K *et al.* Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24:8847–61.

Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H.: Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999; 14:115-125.

Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, *et al.* Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Gen* 1998; 62(6):1370-1380.

Przylepa KA, Paznekas W, Zhang M, Golabi M, Bias W, Bamshad MJ, Carey JC, Hall BD, Stevenson R, Orlow SJ, Cohen MM Jr, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nature Genet* 1996; 13:492-494.

Ratisoontorn C, Seto ML, Broughton KM, Cunningham ML. In vitro differentiation profile of osteoblasts derived from patients with Saethre-Chotzen syndrome. *Bone* 2005; 36:627-34.

Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1994; 8(1):98-103.

Reardon W, Winter RM. Saethre-Chotzen syndrome. *J Med Genet* 1994; 31:393-396.

Reardon W, Wilkes D, *et al.* Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis. *J Med Genet* 1997; 34(8):632-6.

Renier D, Lajeunie E, Arnaud E, Marchac D. Management of craniosynostoses. *Childs Nerv Syst* 2000; 16:645-58.

Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, *et al.* Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 2000; 127: 1845-55.

Robin NH, Feldman GJ, Mitchell HF, Lorenz P, Wilroy RS, Zackai EH, *et al.*: Linkage of Pfeiffer syndrome to chromosome 8 centromere and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Molec Genet* 1994; 3:2153-2158.

Rose CSP, Malcolm S. A TWIST in development. *TIG* 1997; 13(10).

Rosseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, *et al.* Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 1994; 371:252-254.

Rosseau F, El Ghouzzi V, Delezoide AL, 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* 1996; 5:509-512.

Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Baraitser M, Hayward R, Jones B, Malcolm S, Winter RM, Oldridge M, Slaney SF, Poole MD, Wilkie AOM. Identical mutations in FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nature Genet* 1995; 9:173-176.

Schell U, Hehr A, Feldman GJ, Robin NH, Zackai EH, De Die-Smulders C, Viskochil DH, Stewart JM, Wolff G, Ohashi H, *et al.* Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4(3):323-328.

- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000a; 103:211-25.
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, *et al.* Crystal structure of a ternary FGF–FGFR– heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 2000b; 6:743-50.
- Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, *et al.* Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994; 78:335-342.
- Shishido E, Higashijima S, Emori Y, Saigo K. Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 1993; 117: 751-761.
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, *et al.* Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994; 79:1015-24.
- Sulik KK, Beverly R. Rollnick memorial lecture. Normal and abnormal craniofacial embryogenesis. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1990; 26(3):1-18.
- Tarvomina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, *et al.* Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet* 1995; 9:321-328.
- Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J.* 1987; 1(6):434-40.
- Tsai FJ, Yang CF, Wu JY, Tsai CH, Lee CC. Mutation analysis of Crouzon syndrome and identification of one novel mutation in Taiwanese patients. *Pediatr Int* 2001; 43(3):263-6.
- Wilkie AOM, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Asworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, Davd DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, Malcolm S, Winter RM, Reardon W. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature Genet* 1995; 9:165-172.

Wilkie AOM. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1997; 6(10):1647-1656.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991; 64:841–8.

Yayon A, Zimmer Y, Shen GH, Avivi A, Yarden Y, Givol D. A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J* 1992; 11:1885-90.

7- ANEXOS

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DOS PACIENTES COM SÍNDROMES DE CRANIOSSINOSTOSES

Nesta tabela são apresentados os resultados obtidos na investigação molecular dos pacientes portadores de craniossinostoses sindrômicas encaminhados ao ambulatório de Genética Médica do hospital da Universidade Estadual de Campinas. Os resultados foram devidamente encaminhados ao geneticista clínico competente responsável pela consulta.

Pacientes	Suspeita Clínica	FGFR1	FGFR2 exon IIIa	FGFR2 exon IIIc	FGFR3	TWIST1 fragmento 2
1	SDCC	-	-	-	-	-
2	SDCC	-	-	-	-	-
3	SDCC	-	-	-	-	-
4	SSC	-	-	-	-	-
5	SSC	-	-	-	-	-
6	SSC	-	-	-	-	-
7	SSC	-	-	-	-	Ala46Glu
8	SSC	-	-	-	-	-
9	SSC	-	-	-	-	Arg120Cys
10	SSC	-	-	-	-	Arg120Cys
11	SSC	-	-	-	-	-
12	SDCC	-	-	Ser347Cys	-	-
13	SDCC	-	-	-	-	-
14	SDCC	-	-	-	-	-
15	SDCC	-	-	IVS +1 IIIc ds	-	-
16	SDCC	-	-	-	-	-
17	SDCC	-	-	Tyr340Cys	-	-
18	SDCC	-	-	-	-	-
19	SDCC	-	-	-	-	-
20	SDCC	-	-	-	-	-
21	SDCC	-	-	-	-	-
22	Crouzon	-	Ser267Pro	-	-	-
23	SSC	-	-	-	-	-
24	SSC	-	-	-	-	-
25	SSC	-	-	-	-	-
26	SSC	-	-	-	-	-
27	SSC	-	-	Asp321Ala	-	-
28	SSC	-	-	-	-	-
29	SSC	-	-	-	-	-
30	SSC	-	-	-	-	-
31	SSC	-	-	-	-	Asp141His
32	SSC	-	-	-	-	-
33	SSC	-	-	-	-	-
34	SSC	-	-	-	-	-

35	SSC	-	-	-	-	-
36	SSC	-	-	-	-	-
37	Pfeiffer	-	-	-	-	-
38	Pfeiffer	-	-	IVS -1 IIIb as	-	-
39	Pfeiffer	-	-	-	-	-
40	Pfeiffer	-	-	-	-	-
41	Crouzon	-	-	-	-	-
42	Crouzon	-	-	Cys342Tyr	-	-
43	SSC	-	-	-	-	-
44	Crouzon	-	Tyr281Cys	-	-	-
45	SSC	-	-	-	-	-
46	Crouzon	-	-	-	-	-
47	Pfeiffer	-	-	-	-	-
48	Crouzon	-	-	Ser351Cys	-	-
49	Apert	-	Ser 252 Trp	-	-	-

SDCC (Sem Diagnóstico Clínico Conclusivo); SSC (Síndrome de Saethre-Chotzen).

Mutações identificadas:

FGFR2 exon IIIa:

Tyr281Cys - Fenótipo associado à S. de Crouzon - TSAI *et al.*, 2001

Ser 252Trp - Fenótipo associado à S. de Apert - WILKIE *et al.*, 1995

Ser267Pro - Fenótipo associado à S. de Crouzon - OLDRIDGE *et al.*, 1995

FGFR2 exon IIIc:

Ser347Cys - Fenótipo associado à S. de Crouzon - JABS *et al.*, 1994

IVS+1IIIc ds - Fenótipo associado à S. de Crouzon - KAN *et al.*, 2002

Tyr340Cys - Fenótipo associado à S. de Pfeiffer - CORNEJO-ROLDAN *et al.*, 1999

Asp321Ala - Fenótipo associado à S. de Pfeiffer - LAJEUNIE *et al.*, 1995

IVS IIIb -1 - Fenótipo associado à S. de Pfeiffer - PASSOS-BUENO *et al.*, 1999

Cys342Tyr - Fenótipo associado à S. de Crouzon - REARDON *et al.*, 1994

Ser351Cys - Fenótipo grave associado às S. de Crouzon e Pfeiffer - GRIPP *et al.*, 1998; OKAJIMA *et al.*, 1999

TWIST1:

Ala46Glu - Fenótipo associado à S. de Saethre-Chotzen - Não descrita em bancos de dados

Arg120Cys - Fenótipo associado à S. de Saethre-Chotzen - Não descrita em bancos de dados

Asp141His - Fenótipo associado à S. de Saethre-Chotzen - Não descrita em bancos de dados

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/06/06.
(PARECER PROJETO 488/2002)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Adendo que inclui o projeto de pesquisa intitulado “ANÁLISE POPULACIONAL DA MUTAÇÃO Q289P DO GENE FGFR2”, com a finalidade de tese de mestrado do aluno Bernardo Lamartine Nogueira Passarinho, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2006.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

**ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM
DEFEITOS DE LINHA MÉDIA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS
ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

QUAL O OBJETIVO DESSE ESTUDO?

Existem alterações descritas de defeitos de formação e função do cérebro em pessoas que têm alterações do crânio e face. Assim, esse estudo que verificar como o cérebro é (pelo exame de ressonância nuclear magnética - RNM), como é a circulação do sangue nele (pela Tomografia de Emissão de Fóton Único - SPECT) e como estão seus impulsos elétricos (com a realização do eletroencefalograma - EEG).

Dessa maneira, conheceremos melhor essas condições clínicas, as quais poderão ser compartilhadas com outros profissionais da saúde.

COMO ESSE ESTUDO SERÁ FEITO?

Com exceção do SPECT, o restante da investigação já é realizada de rotina, para as alterações do crânio e face.

Também será coletado sangue para guardar o DNA para estudos futuros dessas alterações. De todo modo, antes de qualquer estudo, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, antes de iniciarem. De qualquer maneira, qualquer coisa que seja feita você será informado. Para isso, é importante manter o endereço e telefone de contato atualizado.

Caso os responsáveis desistam do acompanhamento neste serviço ou não sejam encontrados para fornecer autorização específica, fica desde já permitida a utilização deste material, desde que o estudo seja aprovado pelos órgãos competentes (Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). Em qualquer situação, os resultados ficarão à disposição, com os médicos responsáveis por este estudo.

EXISTE RISCO OU DESCONFORTO?

Para realização da RNM, as crianças menores de 5 anos e aquelas de difícil controle necessitarão receber um calmante. Normalmente, isso já é realizado. Durante todo o exame, sempre haverá um dos médicos responsáveis por este estudo.

A anestesia pode, em alguns casos, fazer o coração bater mais rápido, dificuldade para respirar, aumento de saliva na boca e agitação. Todos esses são sintomas temporários.

Para a realização do SPECT, nos casos em que for necessário, poderá ser utilizado anestesia. Para isso, será necessária uma consulta com o anestesista, que é chamado de visita pré-anestésica, que também é rotina nesses casos.

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e com material adequado, mas existe possibilidade de formação de manchas roxas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

**ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM
DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS
ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

QUAIS AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESSE ESTUDO?

Com esse estudo, poderemos saber mais sobre o cérebro e detectar alterações e se for necessário, tomar medidas de prevenção.

De modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o diagnóstico ou tratamento sejam modificados.

Essa investigação, junto com aos exames moleculares que possam vir a ser realizados com o DNA extraído do sangue, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação genética da minha família ou de outras. É importante lembrar que estudos moleculares só serão feitos após os estudos neurológicos e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

QUEM TERÁ ACESSO AOS RESULTADOS?

Os exames que já fazem parte da investigação de alterações de crânio e face farão parte do prontuário médico do indivíduo participante e serão submetidos aos regulamentos do HC - UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Aos indivíduos que são acompanhados em outros hospitais, será fornecido relatório médico com os exames realizados.

Os resultados dos exames estarão disponíveis em no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao paciente ou seu(s) responsável(is), em consulta previamente agendada no Ambulatório de Anomalias Craniofaciais que funciona toda Sexta-feira das 13:00 às 17:00 no 2º andar do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (0XX19) 3788 8908.

Se os resultados, fotografias ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação em revistas científicas, nenhuma identificação será utilizada.

Sempre que os resultados obtidos tenham relevância médica ou sejam importantes para o aconselhamento genético meu ou de minha família, eles serão comunicados à família. Para tanto, caso não haja retorno médico programado, será enviada correspondência referente à data de consulta para receber informações quanto aos resultados desses exames.

Esses resultados não poderão ser informados por telefone, correspondência ou para outras pessoas, ainda que autorizados pelos responsáveis. Por essa razão, é importante manter o endereço de correspondência atualizado.

COM QUEM POSSO ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS?

Qualquer profissional envolvido no projeto poderá prestar esclarecimentos, mas, de preferência, as dúvidas poderão ser esclarecidas com a Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes ou o Dr. Silvyo David Araújo Giffoni, durante consulta ou a pelo tel (0XX19) 3788-8908.

A secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (0XX19) 3788-7232 Também poderá ser contatada, em caso de informações ou reclamações.

A PARTICIPAÇÃO É OBRIGATÓRIA?

De jeito nenhum! Só participarão os interessados. Mesmo assim, se, durante o estudo não houver mais interesse, a participação poderá ser interrompida.

De maneira nenhuma os cuidados médicos rotineiros neste hospital serão interrompidos ou modificados, atualmente ou no futuro.

É importante dizer, também, que, se os profissionais responsáveis considerarem apropriado, a participação do paciente poderá ser suspensa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

**ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM
DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS
ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

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