



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**“ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE
EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS
CON VÍAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN
FIBROBLASTOS DE CALVARIA DE UNA
MUESTRA DE PACIENTES COLOMBIANOS
CON SÍNDROME DE APERT POSTERIOR A
LA DEGRADACIÓN HEPARÁN SULFATO”**

Diana Alexandra Ramírez Montaña

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2016

“ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON VÍAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN FIBROBLASTOS DE CALVARIA DE UNA MUESTRA DE PACIENTES COLOMBIANOS CON SÍNDROME DE APERT POSTERIOR A LA DEGRADACIÓN HEPARÁN SULFATO”

Diana Alexandra Ramírez Montaña

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

Harvy Mauricio Velasco Parra, MD

Especialista en Genética Médica

MsC Ciencias Biológicas

Línea de Investigación:

Anomalías congénitas

Grupo de investigación:

Genética Clínica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2016

A mi madre, por ella y para ella.

Agradecimientos

Agradezco inicialmente a Dios por cada paso que me ha permitido dar en mi vida. Gracias al Dr. Harvy Velasco, por convertirse desde hace varios años en mi mentor y guía en el camino de la investigación, por la confianza en mis capacidades académicas y por la paciencia durante todos estos años. A la Dra. Lilian Torres y al equipo de la Fundación Universitaria en Ciencias de la Salud por su apoyo para la realización de este proyecto. Así mismo, al Dr. Ángel Carracedo y su equipo de la Fundación Pública de Medicina Xenómica en la Universidad de Santiago de Compostela por sus aportes en el análisis de datos que permitieron la interpretación y aprovechamiento de los datos obtenidos.

Gracias a todos los docentes que hacen parte de la maestría por los conocimientos que me han permitido culminar mis estudios de postgrado, especialmente a la Dra. Clara Arteaga por su enorme aporte personal en mi vida y al Dr. Mauricio Rey por su ayuda para solucionar cada una de las dudas que surgieron en la realización de este proyecto. Gracias también a Mireya, por su invaluable amistad que hizo más fáciles los días difíciles y a Claudia, Ángela y Luz Marina por su paciencia y apoyo que fueron indispensables en este logro. Igualmente gracias a Diana Mayorga por sus conocimientos en los pasos iniciales de este estudio indispensables para la realización del mismo.

Gracias principalmente a mi familia, especialmente a mi madre Sandra Montaña, por su infinito e incondicional apoyo, por creer en mí siempre y llevarme con motivación por el camino que hoy me ha permitido alcanzar otro logro en mi vida, el cual espero sea motivo de gran orgullo para ella. Así mismo a mis abuelos, hermanos, suegros, cuñados y a Miguel Ángel por su amor, por estar presente en cada momento de este camino, incluso cuando las cosas se complicaron y apoyarme hasta la culminación de este proceso.

Por último gracias a los pacientes y a todas las personas que se me escapan que permitieron estar presentando hoy los resultados de este trabajo.

Contenido

	<u>Pág.</u>
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VII ¡Error! Marcador no definido.
Resumen y Abstract	I ¡Error! Marcador no definido.
Introducción y planteamiento del problema	I ¡Error! Marcador no definido.
1. Justificación	3
2. Objetivos	5
2.1 Hipotesis	
2.2 Objetivo general	
2.3 Objetivos específicos	
3. Marcos de referencia	7
3.1 Craniosinostosis	
3.2 Síndrome de Apert	
3.2.1 Epidemiología	
3.2.2 Clínica	
3.2.3 Genética	
3.3 Vía molecular FGF/FGFR	
3.3.1 FGFR2 en Síndrome de Apert	
3.3.2 Vía de señalización corriente debajo de FGFR2	
3.3.2.1 Vías de proliferación celular	
3.4 Matriz extracelular en Síndrome de Apert	
3.4.1 Degradación de Heparán Sulfato	
4. Metodología	24
4.1 Fase preanalítica	
4.2 Fase analítica	
4.3 Fase postanalítica	
4.3.1 Análisis de datos	
4.3.2 Análisis bioinformático	

5. Resultados	¡Error! Marcador no definido.	4
5.1 Establecimiento de cultivos celulares		
5.2 Morfología celular		
5.3 Resultados epi-inmunofluorescencia		
5.4 Presencia de isoforma mesenquimal del receptor (FGFR2IIIC) y perfil mutacional de los pacientes		
5.5 Ensayo de linealidad celular		
5.6 Citotoxicidad ocasionada por el fármaco Elaprase ®		
5.7 Expresión génica diferencial analizada por tecnología de Microarray		
5.8 PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para validación de datos de Microarray		
5.9 Aproximación bioinformática a plataformas de interacción proteica		
6. Discusión		71
6.1 Establecimiento de un modelo in vitro con fibroblastos periósticos en pacientes con Síndrome de Apert		
6.2 Relevancia del proceso de proliferación celular en la fisiopatología del Síndrome de Apert		
6.3 Perfil de expresión génica diferencial relacionado con proliferación celular		
6.4 Heparán sulfato como posible blanco terapéutico en Síndrome de Apert		
7. Conclusiones y consideraciones		80
A. Anexo: Consentimiento Informado para inclusion de pacientes en estudio		82
Bibliografía		87

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Proceso de Splicing alternativo en los FGFR 1-3.....	13
Figura 2. Dibujo esquemático que muestra la estructura del receptor y su unión al ligando.....	15
Figura 3. Regulación del proceso de cierre de la sutura craneal mediada por FGFRs... 15	15
Figura 4. Localización de las mutaciones de Apert y otros síndromes clínicos que involucran FGFR2.....	18
Figura 5. Vía de señalización intracelular FGF/FGFR2.....	19
Figura 6. Degradación enzimática de Heparán Sulfato.....	23
Figura 7. Observación microscópica de la Morfología celular.....	36
Figura 8. Imágenes de Epi-inmunofluorescencia.....	37
Figura 9. Presencia de la isoforma del receptor FGFR2IIC (Mesenquimal).....	39
Figura 10. Patrón electroforético de mutaciones en FGFR2 en pacientes SA.....	40
Figura 11. Ensayo de linealidad celular.....	43
Figura 12. Ensayo de Citotoxicidad.....	44
Figura 13. Métricas de calidad del Microarray evaluadas en las muestras.....	47
Figura 14. Heatmap que representa el agrupamiento de las muestras y la expresión genica diferencial.....	64
Figura 15. Anotación funcional en <i>Gene Ontology</i>	65
A. Procesos biológicos (BP).....	65
B. Funciones moleculares (MF).....	65
C. Componente celular (CC).....	66
Figura 16. Genes validados mediante RT-PCR.....	67
Figura 17. Resultados en STRING interacciones de PTPRB.....	69
Figura 18. Red de interacciones proteicas de PTPRB en PINA.....	70

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1: Características clínicas del SA en orden de frecuencia.....	10
Tabla 2. Secuencia de primers usados en experimentos de qRT-PCR.....	31
Tabla 3. Cultivos celulares establecidos.....	34
Tabla 4. Análisis mutacional realizada sobre los cultivos establecidos.....	42
Tabla 5. Cuantificación RNA muestras cultivos 004 y 006.....	45
Tabla 6. Cuantificación RNA muestras cultivos 008.....	46
Tabla 7. Cuantificación RNA muestras cultivos 012.....	46
Tabla 8. Lista de genes y <i>Fold Change</i> en Microarray.....	49
Tabla 9. Categorías funcionales agrupadas.....	62

Resumen

Objetivo: La activación de FGFR2 requiere una configuración entre ligando, receptor y Heparan sulfato (HS). Mutaciones en este receptor afectan el balance proliferación/diferenciación de células osteoprogenitoras ocasionando craniosinostosis. Se postula que degradar HS en tejido perióstico de pacientes con Síndrome de Apert podría alterar la expresión génica relacionada con vías de proliferación celular y modular el comportamiento celular.

Métodos: Fibroblastos periósticos de tres pacientes y un control fueron cultivados y estimulados con FGF2 por 24h y Elaprased®(0.025mg/ml) por 48h. A partir del RNA total se determinó la expresión génica con el Genechip® Human Gene 2.0ST Array(Affymetrix). Las diferencias se establecieron con *fold change* |2|. Los genes fueron anotados usando DAVID(v.6.7). Correcciones al *p* valor se realizaron con los test de Bonferroni, Benjamini, FDR. Algunos genes de interés se validaron mediante qRT-PCR.

Resultados: Los genes de interés diferencialmente expresados a la alta, asociados a proliferación celular fueron: *MMP13, F3, IGF1, IGFBP3, DDX46, DAPL1, SERPINB2 y FGF2* y a la baja: *MTRNR2L2, PTPRB, ATG9A, MAP3K1, COMP, CDH13, TP53TG3, TERF2IP, FGF7, FGF10, PPP2R2B, RUNX2, AKR1B15*. Los genes validados por medio de qRT-PCR fueron *MMP1, CDH3, IGFBP3 y PTPRB*. Los cuales corroboran lo encontrado en el microarray.

Conclusión: El tratamiento modificó la expresión génica relacionada con matriz extracelular y los procesos de proliferación y diferenciación celular. El mayor impacto se evidenció en los genes asociados a matriz extracelular generando supra-regulación para cadherinas/protocaderinas e infra-regulación para metaloproteinasas lo cual contrasta con los modelos previos de la enfermedad. Se propone una recuperación parcial del microambiente celular después del tratamiento.

Palabras clave: *FGFR2*, Elaprased, Craniosinostosis, expresión génica diferencial, Síndrome de Apert.

Abstract

Objective: FGFR2 activation requires a tridimensional configuration between ligand, receptor and Heparan sulfate (HS). FGFR2 mutations affects the osteoprogenitor cells balance between proliferation and differentiation processes, leading to craniosinostosis. We postulate that periostic tissue-HS degradation in AS patients alters the cellular proliferation ways-related gene expression and could modulate the cell behavior.

Methods: Periostic AS fibroblasts from 3 subjects and 1 healthy control were cultivated and stimulated with FGF2 for 24h and with Elaprase® (0.025mg/ml) for 48h by triplicate. Total RNA (>50ng/uL) was obtained to validate the relative expression using the Genechip® Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). The differences in gene expression level were established with fold change ≥ 2 . The data analysis was performed using DAVID (v.6.7). The *p* value corrections were made with Bonferroni, Benjamini and FDR tests. Some genes were validated by qRT-PCR.

Results: The cellular proliferation ways-related upregulated genes were: *MMP13*, *F3*, *IGF1*, *IGFBP3*, *DDX46*, *DAPL1*, *SERPINB2* y *FGF2* and downregulated: *MTRNR2L2*, *PTPRB*, *ATG9A*, *MAP3K1*, *COMP*, *CDH13*, *TP53TG3*, *TERF2IP*, *FGF7*, *FGF10*, *PPP2R2B*, *RUNX2*, *AKR1B15*. The genes validated through qRT-PCR were *MMP1*, *CDH3*, *IGFBP3* y *PTPRB*, these corroborated the microarray findings.

Conclusion: Elaprase treatment modifies the ECM elements expression and the proliferation/differentiation processes. The bigger impact was evidenced in gene groups EMC-related, generating *downregulation* for cadherin/protocadherin and *upregulation* for matrix metalloproteinases. This data contrasts with previous AS models reports. We propose a probable partial extracellular microenvironment recuperation after treatment.

Keywords: *FGFR2*, Elaprase, Craniosynostosis, differential gene expression, Apert Syndrome.

Introducción y planteamiento del problema

El síndrome de Apert (SA) es una de las craneosinostosis sindrómicas más severas que con compromiso del neuro y viscerocráneo, asociada a alteraciones multisistémicas con repercusiones en aspectos físicos (aspecto general y talla baja), sensoriales (hipoacusia y trastornos visuales), cognoscitivos (retardo mental o trastornos del aprendizaje) y de inclusión laboral (sindactilias severas en manos y pies).

A pesar de contar en la actualidad con metodologías de asesoramiento genético y diagnóstico preimplantatorio genético, esta patología, por su inherente patrón de herencia autosómico dominante asociado en más del 90% de los casos con mutaciones *de novo*, se presenta con una frecuencia relativamente homogénea (Incidencia 1: 65.000 recién nacidos vivos) y la única alternativa actual para su manejo es el abordaje quirúrgico el cual es empleado no solo para el moldeamiento craneal, sino para las comorbilidades asociadas a los procesos de craneosinostosis, que impactan principalmente sobre la mortalidad. De estos el evento más importante, por asociarse con muerte temprana y secuelas neurológicas es el aumento de presión intracraneana, la cual es intervenida de manera temprana (6 a 8 meses de vida), y generalmente se requiere de momentos quirúrgicos adicionales para el manejo de los pacientes, que no logran resolver del todo el espectro fenotípico del síndrome de Apert y que además se asocian con tasas de resinostosis tan altas como el 20 al 30%.

Es indispensable establecer alternativas de tratamiento que vayan más allá de la intervención quirúrgica y el manejo de soporte, por lo que se debe conocer más a fondo la fisiopatología del trastorno y el impacto deletéreo de la mutación sobre las vías de expresión relacionadas con los procesos de osificación. Estos conocimientos permitirán

generar nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a reducir o eliminar el impacto de la mutación presente en este tipo de craneosinostosis. Entendiendo la vía molecular asociada con la patología es posible plantear abordajes bioquímicos, como por ejemplo la intervención sobre la cantidad de glucosaminoglicanos (GAGs) de la matriz extracelular, específicamente heparán sulfato (HS) que favorece la función del receptor en su estado normal y mutado, y cuyas implicaciones en la modulación de la expresión fenotípica de la enfermedad, lo convierten en un blanco terapéutico susceptible de intervención.

1. Justificación

El SA es una patología de origen genético, generada por mutaciones en el gen del *Receptor 2 del Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2)*. Las dos mutaciones conocidas que se asocian con la enfermedad son S252W y P253R que afectan la proteína normal en un punto específico de los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, siendo la más severa la mutación P253R. Ambas mutaciones se relacionan con el incremento de la afinidad por sus ligandos naturales (FGF), activando múltiples vías de señalización relacionadas con proteínas kinasa, las cuales son redundantes y terminan promoviendo una aberrante y prematura osificación de las suturas craneales por procesos acelerados de proliferación y diferenciación de los fibroblastos.

En la actualidad se ha avanzado en el conocimiento fisiopatológico de la enfermedad y sus bases genéticas, lo que ha permitido identificar muchas vías moleculares que podrían mediar en el desarrollo del fenotipo y su pleiotropia. En este contexto, se ha reconocido la necesidad para la activación del receptor de la interacción del FGFR2 con proteínas de la Matriz Extracelular (MEC), específicamente glicosaminoglicanos de tipo Heparán sulfato (HS), convirtiéndose en un mediador indispensable de la unión ligando – receptor, y un reservorio para los ligandos en el medio extracelular.

La evidencia ha mostrado que el tejido óseo de pacientes con Apert, podría presentar un incremento en la cantidad de HS, sin conocerse la existencia de una reducción de las actividades de enzimas que lo degradan. Se hace necesario entonces, realizar estudios de intervención *in vitro*, con enzimas específicas para la degradación de HS

en los tejidos afectados (fibroblastos subperiósticos) de pacientes con SA para verificar el impacto global sobre el fenotipo.

Se postula que la reducción de las concentraciones de este glicosaminoglicano por la acción de las enzimas de degradación, podría modificar la expresión génica downstream (Corriente abajo) de FGFR2. El tipo de ensayo planteado, sin antecedentes en la literatura, permitirá demostrar la presencia de una expresión diferencial de estos perfiles en tejido de pacientes con Apert sometido a la degradación de HS y podría ser el primer acercamiento hacia una nueva alternativa terapéutica en el manejo de pacientes con SA, además de brindar posibles explicaciones que influyan en el entendimiento de la pleiotropía y la severidad de esta enfermedad.

Hasta el momento los resultados encontrados en estudios de expresión génica son contradictorios en cuanto a la especificidad de las vías relacionadas con los procesos de osificación aberrante. Por un lado, se propone que el receptor FGFR2 mutado favorecería cambios en el estado de proliferación celular de las células mesenquimales progenitoras a nivel de las suturas craneales de manera temprana, y por el otro que se relacionaría con procesos anormales de apoptosis. El otro componente, se relaciona específicamente con las vías de diferenciación celular, específicamente la diferenciación en el linaje osteoblástico que ocurre de manera prematura, y que depende de los estados proliferativos que la preceden y del momento del desarrollo, ya que marcan el inicio del proceso de osificación que culmina con el establecimiento de las células adultas. Al momento se acepta que hay una perturbación general de ambos procesos que ocurre de manera temprana y que en conjunto pueden explicar los hallazgos revelados por los modelos murinos, en los cuales la osificación esta alterada desde estados embrionarios.

2.OBJETIVOS

2.1. Hipótesis: existen diferencias significativas en los perfiles de expresión génica relacionados con procesos de proliferación celular en el tejido fibroblástico subperióstico de pacientes con Síndrome de Apert cuando estos son sometidos a procesos de degradación de Heparán Sulfato.

2.2. Objetivo general: Analizar la expresión génica relacionada con proliferación celular en fibroblastos subperiósticos de calvaria de una muestra de pacientes colombianos con mutaciones en *FGFR2* con síndrome de Apert antes y después de ser sometidos a procesos de degradación de Heparán Sulfato de la matriz extracelular.

2.3. Objetivos específicos

- Identificar los genes sub (down) o sobre (up) regulados en fibroblastos con las mutaciones P253R y S252W en *FGFR2* que se relacionen con procesos de proliferación celular.
- Identificar los genes sub (down) o sobre (up) regulados en fibroblastos con las mutaciones P253R y S252W en *FGFR2* que se relacionen con procesos de proliferación celular cuando es sometido a tratamiento con enzimas que degradan HS de la matriz extracelular.
- Comparar los perfiles de expresión entre las muestras de fibroblastos que sometidos o no a procesos de degradación de HS.

- Analizar las vías moleculares relacionadas con procesos de proliferación celular y características clínicas del síndrome de Apert a partir de los hallazgos de expresión génica diferencial.
- Realizar una aproximación bioinformática de las vías y redes moleculares que se encuentran diferencialmente expresadas.

Alcance de la propuesta: se intentó aclarar si las modificaciones realizadas con el tratamiento en la matriz extracelular afectaban el proceso de proliferación celular, determinando la existencia de genes relacionados con procesos proliferativos o apoptóticos que se debaten actualmente en la literatura. Dado que el receptor alterado en el síndrome de Apert (FGFR2) también se ha relacionado con procesos de diferenciación celular, esta aproximación pretendió elucidar cuál de los dos procesos podría ser protagonista en la fisiopatología de la enfermedad, o si a la luz de las evidencias, estos procesos son ambos orquestados en diferentes momentos embriológicos y contribuyentes en mayor o menor medida a los signos expresados en los pacientes afectados con el síndrome de Apert. Los resultados de estudios previos enfrentan ambas vías sin lograr aclarar cuál es la protagonista y con resultados contradictorios.

3. Marcos de referencia

3.1. Craniosinostosis

Las suturas craneales son articulaciones a lo largo del cráneo en los márgenes adyacentes a los huesos que lo forman y cuyo crecimiento se produce a través de osificación intramembranosa (1, 2). Las fontanelas que se forman en los límites de unión de las suturas craneales son grandes áreas de tejido conectivo producidas sin hueso subyacente. La fusión de las suturas durante el desarrollo normal debido a su osificación, produce inicialmente el cierre de la fontanela en la parte posterior y luego en la fontanela anterior entre los 3 y 20 meses respectivamente (1).

Este proceso que se inicia en la vida prenatal, facilita el moldeamiento del cráneo durante el parto, el ajuste de la estructura ósea craneal para la expansión cerebral de los primeros años de vida y la tolerancia al trauma mecánico en la infancia (2).

La craniosinostosis está definida como el cierre o fusión prematura (antes del mes 20 de vida) de las suturas craneales. Es una malformación común que ocurre en aproximadamente 1 de cada 2.500 nacimientos vivos (1). Puede ser clasificada desde diferentes perspectivas: Simple (Involucra una sutura) o compleja (Involucra 2 o más puntos de sutura); primaria (Causada por un defecto intrínseco de la sutura) o secundaria (Condiciones médicas subyacente como crecimiento deficiente del cerebro, hipoxia neonatal) y aisladas (sin otras anomalías asociadas) o sindrómicas (acompañado por rasgos dismórficos o defectos congénitos).

Las suturas involucradas en las craniosinostosis en orden de frecuencia son:

- Sagital 40-58%, de etiología desconocida;
- Coronal 20-29%, se estima que un tercio causadas por mutaciones puntuales;
- Metópica 4-10% de etiología desconocida y
- Lamboidea 2-4% igualmente sin etiología conocida.

Cerca del 85% de las craneosinostosis son no sindrómicas, sin embargo, se han identificado cerca de 200 síndromes genéticos que se manifiestan con craneosinostosis (OMIM) (1). Las mutaciones en *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *TWIST* son las más comúnmente asociadas (1, 3, 4).

3.2. Síndrome de Apert

El SA o Acrocefalosindactilia tipo I (MIM #101200) es un desorden congénito, descrito por primera vez por Eugene Apert en 1906, caracterizado por craneosinostosis coronal, sindactilia simétrica de las cuatro extremidades y malformaciones craneofaciales (5). Este síndrome es considerado como una de las formas más severas de craneosinostosis y es causado por dos mutaciones en el Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (*FGFR2*).

3.2.1. Epidemiología.

Representa el 4,5% de todas las craneosinostosis sindrómicas. Su incidencia se estima en 1:60.000 recién nacidos vivos, siendo más común en ciertas regiones geográficas como Asia, con incidencias de 2:10.000 (6-8). En Colombia no existen estadísticas formales acerca de la incidencia de este síndrome en la población, sin embargo, en un reciente estudio realizado por el grupo de Genética clínica de la Universidad Nacional, con 7 pacientes afectados, se encontró una relación en las mutaciones similar al reportado en la población general con una prevalencia del 70% de la mutación para S252W y el 30% restante para P253R(9).

Se estima que las enfermedades genéticas en conjunto representan en la actualidad más de dos tercios de las admisiones pediátricas y el 80% de la carga económica de los servicios de urgencias pediátricas. En particular las de origen monogénico, como el síndrome de Apert representan en conjunto el 5,5% de las

admisiones de urgencias pediátricas anuales. Con un promedio de días de hospitalización de 7.1 (6.0–8.2) y un promedio de costos anuales de \$17,218US (\$13,234–\$21,440US) (10, 11).

3.2.2. Clínica.

Las características típicas del esqueleto de los pacientes con SA , además de evidenciar el compromiso de las suturas craneales coronal y metópica en algunas ocasiones, consiste en sindactilia óseas, sinoniquia (4, 12, 13) y talla baja por defectos de la osteogénesis/condrogenesis/displasia epifisiaria (12, 14-16). También se han reportado alteraciones a nivel de la base del cráneo observándose alteraciones faciales como hipertelorismo ocular, proptosis, hipoplasia del tercio medio facial, maloclusión severa (17, 18)

Otros defectos asociados incluyen el compromiso del SNC manifestado por estenosis del foramen yugular, ventriculomegalia, ausencia parcial o completa del *septum pellucidum* y defectos del cuerpo calloso junto con Retardo Mental, presenta hasta en el 52% de los pacientes (19). Adicional a esto se ha reportado la pérdida de la audición secundaria a la fusión de la cadena de huesecillos del oído interno (1, 13).

Las anomalías viscerales están presentes en cerca de la mitad de los pacientes afectados, de estas las alteraciones cardíacas como la estenosis de arteria pulmonar, defectos del septo ventricular, ductus arterioso persistente y fibroelastosis endocardial se encuentran en el 10% de los pacientes y las genitourinarias como riñones poliquísticos, hidronefrosis, útero bicorne, atresia vaginal y criptorquidia en 9.6% de los pacientes (1, 19). La **Tabla 1** resume las principales características clínicas reportadas en el Síndrome de Apert.

El diagnóstico se realiza clínicamente dados los hallazgos fenotípicos exclusivos al síndrome. Las imágenes como la Tomografía axial computarizada (TAC) con reconstrucción 3D y Resonancia magnética nuclear (RMN) cobran relevancia para la planificación de las cirugías correctivas a realizar (20, 21).

Tabla 1. Características clínicas del SA en orden de frecuencia

CARACTERÍSTICA CLÍNICA*	FRECUENCIA
Sindactilia de los 3 dedos centrales (mano)	100%
Hiperhidrosis	100%
Estenosis del foramen yugular	95%
Ventriculomegalia cerebral	76%
Anormalidades en canales semicirculares	70%
Fusión de vértebras cervicales	68%
Estrabismo	60%
Anomalías viscerales	50%
Inteligencia normal o limitrofe	48%
Fusión cervical simple	37%
Fusión cervical múltiple	31%
Retardo mental leve	30%
Ausencia parcial del <i>septum pellucidum</i>	23%
Defectos del cuerpo calloso	23%
Anisometropía	19%
Ausencia de <i>septum pellucidum</i>	17%
Retardo mental moderado	14%
Ambliopía	14%
Hidrocefalia	13%
Queratopatía	8%
Atrofia óptica	8%
Retardo mental severo	7%
Polidactilia postaxial	7%
Herniación crónica de las amígdalas	1.9%

Tomada y modificada de Gorlin RJ. Cohen MM Jr, Levin LS. Syndromes of the head and the neck. Oxford University Press 3º Edición 1990- USA- Cap. 14- 15.

El diagnóstico diferencial del síndrome de Apert se hace con otros síndromes de craneosinostosis y alteración de las extremidades en grado variable, como el síndrome de Pfeiffer relacionados también con mutaciones en *FGFR2* y los síndromes de Saethre Chotzen y Carpenter (2, 22, 23).

El seguimiento de estos pacientes es multidisciplinario, requiriéndose manejo por cirujanos plásticos, neurocirujanos, pediatra, ortodoncista, oftalmólogo, audiólogo, genetista y psicólogo para el paciente y su familia (24).

El enfoque neuroquirúrgico incluye craneotomía, la cual se recomienda antes de cumplir el primer año, para descomprimir el cerebro y evitar de esta forma el aumento de la presión intracraneal (PIC) a medida que el cerebro se expande, lo cual puede conducir a la muerte del paciente (20, 21, 25). En la infancia tardía se realizan cirugías para el avance del tercio medio facial que mejora el flujo nasal y disminuye las infecciones respiratorias secundarias que son frecuentes en estos pacientes, y la cirugía ortognática en la adolescencia que mejora la oclusión dental y la estética del paciente (25).

Debido al compromiso de las extremidades se presentan limitaciones funcionales las cuales pueden ser corregidas mediante distintas técnicas quirúrgicas, en muchas ocasiones mediante múltiples intervenciones, lo cual favorece el desempeño personal de aquellos pacientes que no presentan otras limitaciones de tipo cognitivo (25, 26).

3.2.3. Genética.

El SA presenta un patrón de herencia autosómico dominante y se considera que más del 90% de los casos de esta enfermedad surgen de forma esporádica (27). El defecto molecular se encuentra en el gen *FGFR2* cuyo locus es 10q26, cuya longitud es de 120kb, posee un total de 18 exones, de los cuales 17 son codificantes (23).

En 1995 y 2000 Wilkie et al (7), en un estudio con 40 pacientes con SA encontró la presencia de las únicas dos mutaciones relacionadas hasta el momento con la enfermedad: S252W y P253R. Ambas mutaciones involucran cambios en aminoácidos adyacentes a la región de unión del receptor entre los dominios II y III de tipo inmunoglobulina. La mutación S252W es más frecuente (65-70% de los casos) y se relaciona con paladar hendido (18). Mientras que la mutación P253R se relaciona con sindactilia más severa en pies (18), y es la única que reproduce de manera completa el fenotipo en modelos murinos (17).

3.3. Vía molecular FGF/FGFR.

La importancia de la vía de los factores de crecimiento de fibroblastos y su receptor FGF/FGFR en el desarrollo del esqueleto se ha puesto en evidencia con los numerosos trastornos que resultan de mutaciones en *FGFR* y que pueden ser clasificados en dos grandes grupos: condrodisplasias y craneosinostosis (28-30).

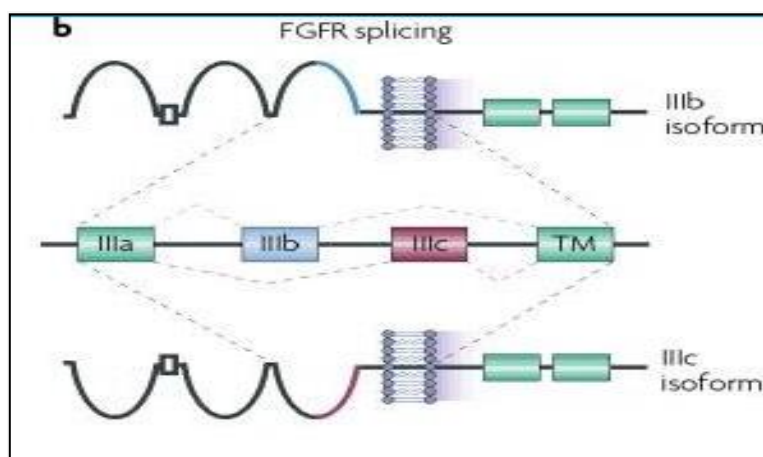
Los primeros comprometen principalmente los huesos que sufren osificación endocondral y son resultado de mutaciones en *FGFR3* principalmente (31-33), mientras que las craneosinostosis sindrómicas son atribuibles a mutaciones en *FGFR1*, *FGFR2* y *FGFR3*. Las mutaciones observadas en estos síndromes sugieren que existen diversos mecanismos patológicos relacionados con mutaciones puntuales y que los efectos de la vía FGF/FGFR son pleiotrópicos (22, 30, 33).

La familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) está compuesta por 23 miembros cuyos efectos de señalización están mediados por la unión a receptores de alta y baja afinidad (28, 34, 35). Los de alta afinidad o aquellos para quien FGF se comporta como ligando natural, son la familia génica de los FGFR compuesta por cuatro integrantes FGFR1 a FGFR4. El gen del *FGFR1* se ubica en el cromosoma 8, el del *FGFR2* en el 10, *FGFR3* en el 4 y *FGFR4* en el cromosoma 5 (2, 15, 36).

Los diferentes FGFRs tienen una estructura proteica similar que consiste en tres porciones: la primera de unión a ligando extracelular con tres dominios tipo Inmunoglobulina (Igl, IgII y IgIII) de los cuales los dominios 2 y 3 constituyen el sitio de unión; un dominio transmembrana único y una porción citoplasmática con actividad tirosin kinasa (23, 37).

Tres de los cuatro isotipos de FGFR, el 1, 2 y 3, mediante un proceso de splicing alternativo, usan dos exones (8 y 9) para codificar alternativamente la región C-terminal del tercer dominio Ig (IIIb y IIIc)(15). Este proceso crea ARNm tejido-específicos de las isoformas b y c, las cuales se unen a distintos subconjuntos de FGF y que se ubican a nivel de fibroblastos epiteliales (Isoforma IIIb) o a nivel de las células mesenquimales relacionadas con osificación intramembranosa (Isoforma IIIc) (38, 39). La región restante del tercer dominio (IIIa) es codificado por el exón 7 para ambas isoformas, región en la cual ocurren generalmente las mutaciones relacionadas con síndrome de Apert (40-42). Mutaciones en estos sitios conducen a cambios en la orientación relativa de los dominios afectando la vinculación del ligando (**Figura 1**).

Figura 1. Proceso de Splicing alternativo en los FGFR 1-3



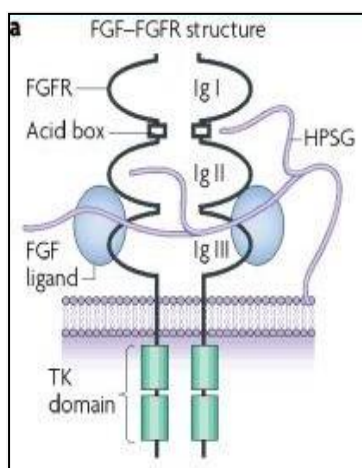
Tomado y modificado de: *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nature reviews Cancer, 10-2010. (43)

Al ser receptores tipo tirosin kinasa, sufren un proceso de dimerización como paso crítico necesario para su activación y el inicio de la cascada de señalización corriente abajo (37). Los mecanismos de regulación consisten en procesos de retroalimentación negativa (feedback negativo) que involucran la internalización del receptor y la degradación de los factor de crecimiento FGFs, lo cual atenúa la señalización posterior a su activación (36, 37). En este proceso participan proteínas como la CBL ubiquitina ligasa y la proteína de acoplamiento FGFR sustrato 2 (FRS2a) las cuales al encontrarse mutadas pueden alterar el proceso normal de degradación y contribuir a la diferenciación prematura de osteoblastos evidenciada en la craneosinostosis humana (32, 44). La cascada intracelular de los FGFR se ha relacionado con diversos procesos como mitogénesis, diferenciación, apoptosis y migración (28), sin embargo, esta cascada requiere de la participación de elementos adicionales al ligando (45).

Los efectos biológicos de los FGFs están mediados por la asociación con proteoglicanos tipo HS. La activación del receptor está mediada por el HS asociada con el ligando (FGF) y el ligando con el receptor (38, 46, 47), pero también se ha observado que el HS probablemente se asocie a otros receptores de baja afinidad (48). **(Figura 2).**

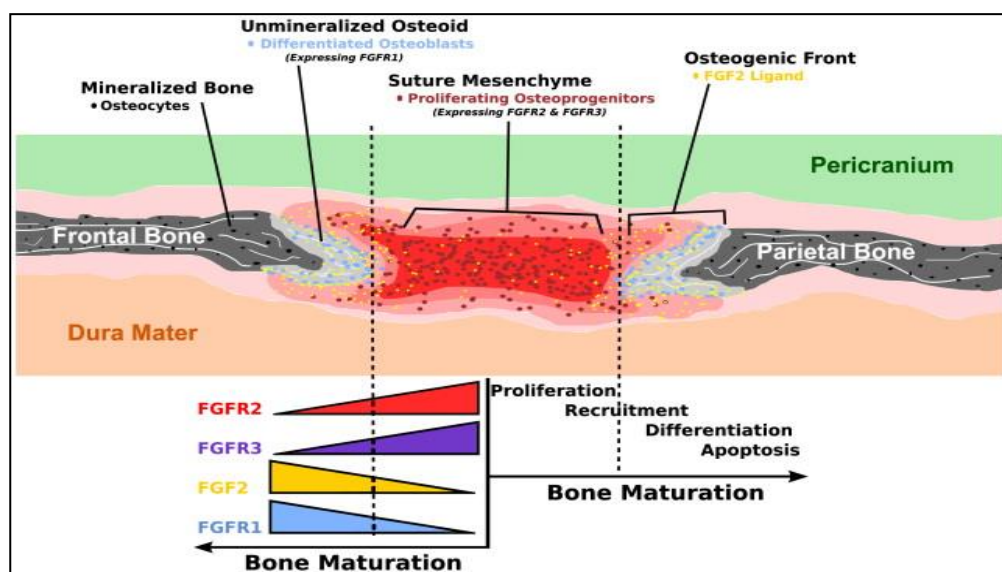
La señalización FGF/FGFR controla la formación del hueso. En las suturas craneales y las extremidades durante el desarrollo es crucial para la progresión de los fibroblastos hacia el periostio y la proliferación y diferenciación de las células progenitoras en el proceso de crecimiento y cierre de las suturas en la los cuales también se ven involucrados los receptores FGFR1 y 3 los cuales actúan concertadamente y en tiempos específicos en las zonas proliferantes (FGFR2 y 3) y en el frente osteogénico donse se regulan los procesos de diferenciación y donde hay presencia activa de FGF2 (46, 49). **(Figura 3)**

Figura 2. Dibujo esquemático que muestra la estructura del receptor y su unión al ligando.



Tomado y modificado de: *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nature reviews Cancer, 10-2010.(43) - HPSG: Proteoglicano Heparan Sulfato.
TK: tirosin quinasa. Ig: Dominio tipo Inmunoglobulina

Figura 3. Regulación del proceso de cierre de la sutura craneal mediada por FGFRs.



Tomada de: Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. Genes & Diseases. October 2014(50).

En modelos de ratón Knockout para FGF2 y FGFR2 se encuentra una menor densidad ósea, reducción de la proliferación de las células progenitoras y funciones anormales de los osteoblastos maduros (44, 51), además los ratones mutados para FGFR2 presentan craneosinostosis por aumento de la diferenciación celular (52, 53).

La regulación principal de este proceso ocurre sobre la osteoblastogénesis, donde se controla específicamente la proliferación de células indiferenciadas y la diferenciación de las células mesenquimales estromales de la médula ósea por lo cual se ha atribuido un efecto anabólico óseo fuerte *in vivo* (41). Recientemente se ha demostrado que este efecto estimulador de la proliferación ocurre a edades embrionarias tan tempranas como E13 (Embriones de 13 días) en los modelos murinos (18, 52, 53).

En células mesenquimales y osteoblastos, FGF2 activa una gran cantidad de vías de señalización incluyendo Proteínas activadas por mitógenos (MAP) las cuales después de ser activadas por la señal regulatoria extracelular continúan activando cascadas intracelulares tipo quinasas como ERK, p38, MAP quinasa y Proteína C quinasa (PKC), todas relacionadas con la proliferación osteoblástica y supervivencia celular por lo cual se ha considerado FGF2 como el ligando más importante en la vía FGF/FGFR relacionada con hueso (32, 54).

En general se acepta que las mutaciones en el dominio extracelular, como ocurre en el caso del Síndrome de Apert generan su fenotipo por asociarse con mayor unión del ligando (mayor afinidad) o una alteración de la especificidad de ligando. Las mutaciones en la región transmembrana favorecen la dimerización del receptor y su activación constitutiva aún sin presencia de ligando y las mutaciones en el dominio quinasa conllevan un aumento de la activación constitutiva, degradación alterada del receptor y una continua señalización y pérdida de la función que se ha visto

recientemente asociado a distintos cánceres como los de próstata, pulmón, mama y cáncer gástrico (40, 55-59).

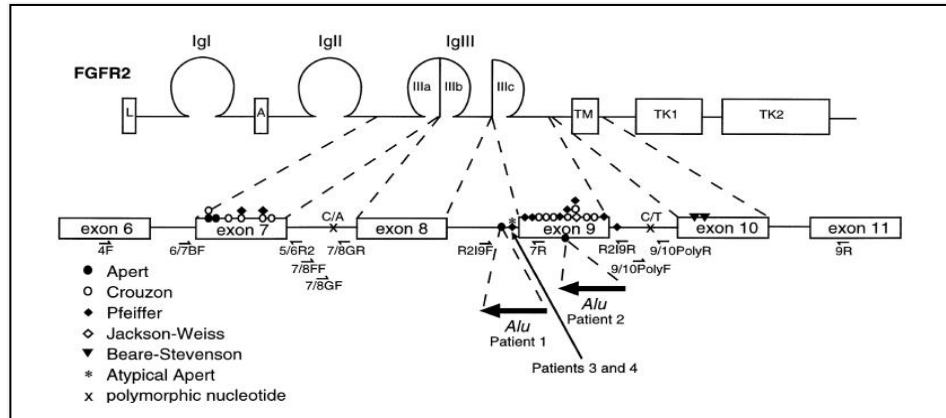
3.3.1. *FGFR2* en Síndrome de Apert.

La mutación en el receptor *FGFR2* de los pacientes con Apert se localizan en el dominio extracelular, más precisamente en dos aminoácidos adyacentes Serina 252 y Prolina 253 en la región entre el II y III dominio tipo Ig codificados por el exón 7 (**Figura 4**).

En condiciones normales, la isoforma *FGFR2b* es reconocida por los ligandos *FGF2*, *FGF6* y *FGF9*. La mutación *S252W* favorece el splicing alternativo para la isoforma *FGFR2c* que permite ser activada por ligandos adicionales como *FGF7* y *FGF10* (15, 40, 60) mientras que la mutación *P253R* confiere una mayor afinidad por *FGF10* (17). Ambas mutaciones pueden generar cambios en la conformación de los dominios de unión con lo cual se podría favorecer la unión de ligandos ectópicos (60).

Anderson et al, en 1998 (40), con experimentos *in vitro* demostró que las dos mutaciones reportadas generan unión mejorada a *FGF2* y otros muchos *FGFs* en las suturas craneales, proponiendo que estas mutaciones se comportan como una ganancia de función del receptor. Ibrahimi et al, en 2001 (60), pudieron verificar la presencia de enlaces adicionales del receptor a la porción N-terminal de *FGF2* por la introducción del residuo hidrofóbico del Triptófano en la posición 252, los cuales pueden resultar en una mayor unión del ligando. Por otra parte la mutación *P253R* parece afectar la estabilidad de la unión al receptor en su afinidad y especificidad lo que podría permitir la activación paracrina o autocrina de *FGFR2* (17, 40).

Figura 4. Localización de las mutaciones de Apert y otros síndromes clínicos que involucran *FGFR2*.



Tomado de: Oldridge et al. De novo alu-element insertions in *FGFR2* identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 446-61.

3.3.2. Vía de señalización corriente abajo de *FGFR2*.

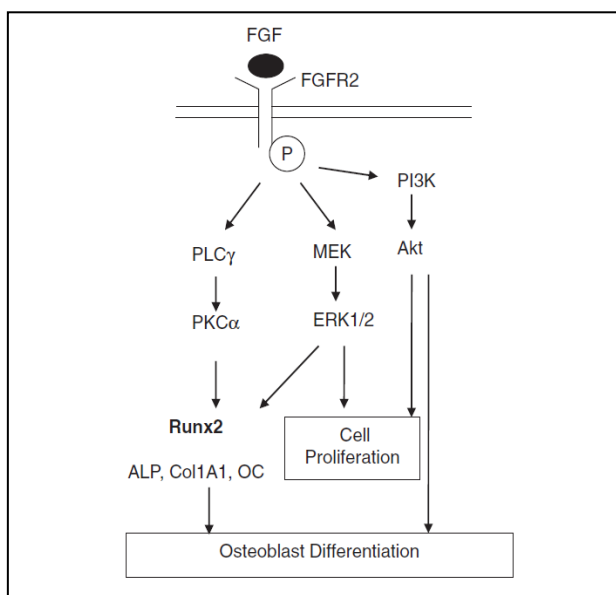
La vía intracelular de quinasas es activada por la unión de FGF al receptor, el cual sufre un proceso de dimerización y fosforilación. En esta vía están involucradas proteínas como MAP quinasa, ERK, PI3K, PKC y P38 las cuales modulan dos procesos críticos, la proliferación celular y la diferenciación.

3.3.2.1 Vías de proliferación celular.

La activación de ERK 1/2 se ha relacionado con la proliferación celular en las células precursoras de osteoblastos y controla a su vez la diferenciación mediada por *FGFR2*(61). La vía del fosfatidil inositol 3 fostato quinasa (PI3K) participa en el control de la osteoblastogenesis mediada por FGF, promoviendo la proliferación celular de células progenitoras y su diferenciación de forma similar a ERK 1 y 2 (51, 54). Estos resultados ponen

de relieve las múltiples vías de señalización que pueden mediar los efectos positivos de FGF/FGFR (34, 35, 50)(Figura 5).

Figura 5. Vía de señalización intracelular FGF/FGFR2



Tomado de: Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation: An update. *Gene*. 2003

FGF2 también participa como un determinante crítico de la masa ósea mediante la modulación de la señalización vía Wnt-B-Catenina en ratones (62). Esta vía se ha relacionado con el cierre de las suturas craneales, ya que la activación de la señalización causa un cierre prematuro y se asocia con procesos de morfogénesis de múltiples tejidos (45).

Varios estudios han mostrado que en los procesos de craneosinostosis desencadenados por la activación de *FGFR2* mutados se promueve la diferenciación de los osteoblastos a través del aumento de *Runx2* evidenciándose en la expresión de genes marcadores de osteogénesis (34, 63-65). Sin embargo *Runx2* parece cooperar en esta vía controlando tanto la proliferación de osteoblastos, como su diferenciación mediante la regulación de

los componentes de la matriz extracelular como los GAG y los proteoglicanos (63, 64, 66).

Otras proteínas relacionadas con la vía de señalización FGF/FGFR son las BMP (bone morphogenic protein), específicamente BMP-2, la cual se relaciona principalmente con crecimiento endocondral, encontrándose regulado a la alta *in vivo* después de aplicación de FGF2 en huesos favoreciendo la expresión *Runx2*(67, 68).

Varios residuos de tirosina fosforilados por la acción quinasa del *FGFR* activado sirven como sitio de anclaje para proteínas como SOS, GRB2 y GAB1, que permiten el ensamblaje de complejos de señalización que promueven la activación de vías Ras/Raf/PI3K que se comportan como moduladores de la proliferación celular (61) y que se han asociado con procesos cancerígenos. Niveles elevados de *FGFR2* y otros FGFRs se han asociado con numerosos cánceres incluyendo cáncer de próstata, mama, pulmón, glioblastoma cerebral, sarcomas y tumores de cabeza y cuello (55, 57, 59, 69, 70). Se ha propuesto un rol de este receptor en los procesos de amplificación y crecimiento tumoral, favorecidos por la disregulación de vías de proliferación celular, así como efectos pro-supervivencia que se manifiestan por la alteración de los procesos normales de apoptosis (55).

3.4. Matriz extracelular en síndrome de Apert.

La osificación intramembranosa propia de las suturas craneales depende de la diferenciación a osteoblastos por un proceso de maduración de las células mesenquimales. Este proceso se relaciona con un programa de expresión que regula la proliferación diferencial y la mineralización de la matriz ósea, donde participan señales paracrinas, autocrinas y hormonales así como interacciones de receptores y ligandos con elementos de la matriz extracelular (MEC) (71-73).

Los modelos animales en los cuales se suprime la biosíntesis de GAGs tienen una pérdida completa de la señalización FGF/FGFR (46). En el caso particular de FGFR2, se ha demostrado que las moléculas de la MEC tipo HS, son indispensables su interacción con el respectivo ligando (39, 47).

Se ha demostrado *in vitro* que fibroblastos obtenidos de periostio de pacientes Apert, presentan un aumento de GAG de tipo Ácido hialurónico (HA), Heparán sulfato (HS), Condroitín sulfato (CS) y Dermatan Sulfato (DS) secundario a estímulos dependientes de un desequilibrio entre IL-1 y 6 y TGFB-1 (49, 71, 72), observando que los factores locales que regulan la producción de la MEC son el Factor de crecimiento transformante B (TGF-B), las interleuquinas (IL) y los FGF (49, 71).

En otro estudio, Carinci et al (74), en el mismo tipo de tejidos describió alteraciones en la producción de moléculas de la MEC con una sobreexpresión de GAGs, especialmente HS, además de fibronectina y colágeno, junto con una disminución paralela en la actividad de enzimas como proteasas, glicosidasas y metaloproteasas implicadas en la degradación de la MEC y en el proceso de remodelamiento craneal.

Con estas múltiples se postula que las características clínicas pleiotrópicas en pacientes con SA, deben explicarse en el contexto de las mutaciones puntuales y de su compleja interacción con proteínas de MEC, tipo HS (48, 73, 74).

3.4.1. Degradación de Heparan Sulfato

El HS es uno de los principales GAGs de la MEC e interviene en la formación de huesos, cartílagos, tendones, cornea, piel y tejido conectivo además del líquido sinovial. Es una molécula negativamente cargada, con una formación extendida

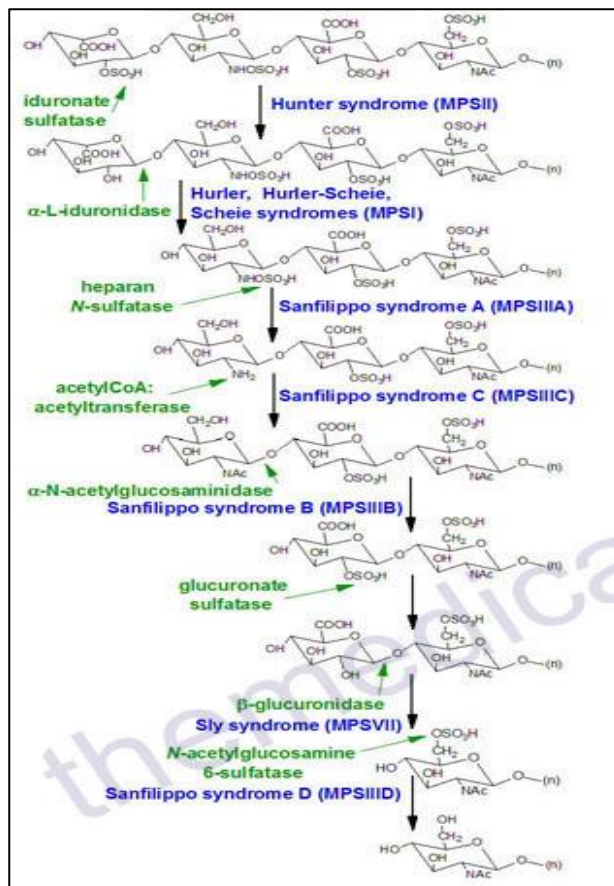
que brinda alta viscosidad a las soluciones y está formado por la unión de α -glucosamina (sulfatada o acetilada), ácidos idurónico y glucorónico (47).

La degradación del Heparán Sulfato (HS) se realiza mediante la acción de enzimas tipo glicosidasas, sulfatasas y una N-acetiltransferasa. Las tres enzimas que participan en la degradación del heparán sulfato son: α -L-iduronidasa, L-iduronato-2-sulfatasa y Heparán Sulfatasa, en una vía común que permite la degradación de otros tipos de GAGs (**Figura 6**). La primera enzima del proceso de degradación es la L-Iduronato-2-sulfatasa, razón por lo cual se considera la enzima indicada para el desarrollo del experimento ya que se pretendía garantizar una completa degradación del glicosaminoglicano.

Debido a que la mayoría de los GAGs en el cuerpo están unidos a proteínas centrales y forman los denominados proteoglicanos o Mucopolisacaridos, alteraciones de estas enzimas producen enfermedades de depósito lisosomal como las Mucopolisacaridosis (MPS). Para el caso de las MPS tipo I, II y IIIA, se ha observado un incremento en las concentraciones de varios GAGS, pero especialmente HS, DS y CS (47).

En el momento existen en el mercado formas sintéticas de α -L-iduronidasa (ALDURAZIME®), L-iduronato-2-sulfatasa (ELAPRASE®) y la Heparan sulfatasa (Medicamento en fase II, bajo el Brand de SHIRE Inc.). De las cuales se hará uso de (ELAPRASE®) para realizar la degradación de HS.

Figura 6. Degradación enzimática de Heparán Sulfato



Enzimas relacionadas en el proceso de degradación fisiológica de Heparan Sulfato. *MPS*:

Mucopolisacaridosis. Tomada y modificada de:

<http://themedicalbiochemistrypage.org/largeglycandegradation.php>

4. Metodología.

4.1. Fase pre analítica.

Estudio de intervención, de tipo experimental, *in vitro*, sobre una muestra tejido fibroblástico subperióstico de 3 pacientes con SA con las mutaciones S252W o P253R en *FGFR2*. El tamaño de muestra es a conveniencia pero también se tuvo en cuenta los reportes de estudios similares con el mismo tamaño de muestra (66). Se usará un control sano no afectado con ningún tipo de craneosinostosis.

La toma de muestra se realizó en las instalaciones del Hospital Infantil Universitario San José.

4.2. Fase analítica.

1. Previa aprobación del consentimiento informado por el comité de ética institucional de la Universidad Nacional y de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, firma del mismo por el paciente, los padres o tutores del paciente menor de edad y asentimiento del menor según sea el caso, se procedió a la toma de muestra de sangre y de tejido subperióstico en el momento de la cirugía de corrección de craneosinostosis o en un tiempo quirúrgico secundario. El abordaje quirúrgico se realizó por incisión coronal hasta el plano subgaleal, se detectó la zona de sinostosis y se marcó un rectángulo que involucro suficiente tejido y teniendo cuidado de tomar periostio adherido a hueso justo en la sutura sinostosada con un craneotomo. La muestra fue recolectada en un tubo falcón estéril que contenía 5 ml de DMEM, con suero fetal bovino y antibiótico y se envió al laboratorio. Mientras se continuó con la cirugía planeada en forma rutinaria, esta información fue tomada del protocolo establecido por el cirujano colaborador en el proyecto Dr. Rolando Prada del Hospital Infantil Universitario San José.

2. Posterior a contar con el explante óseo se procedió al cultivo celular de los fibroblastos subperióísticos de 3 pacientes con SA y un paciente control a partir en las instalaciones de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS), inicialmente el explante fue disgregado en segmentos de aproximadamente 2 a 3mm, colocado en medio de cultivo DMEM® (Gibco) alto en glucosa (4500 suplementado con suero fetal bovino al 10% más antibiótico Penicilina/Estreptomina al 1% a 37°C y 5% de CO₂, el crecimiento de los fibroblastos fue monitoreado mediante observación del cultivo celular en microscopio invertido. Una vez se obtuvo confluencia de 70-80% y se realizó el primer pasaje los cultivos fueron transportados hacia las instalaciones del laboratorio 3 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional y se realizaron subcultivos (máximo 5) con el fin de obtener la concentración de células necesaria para los experimentos. Toda la población celular obtenida fue usada para los ensayos diseñados en el experimento.

El mantenimiento de los cultivos celulares se realizó en medio DMEM® (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10%, y Gentamicina (100 µg/mL), en frascos de cultivo celular de 25 y 75 cm² (Corning®). Las condiciones de cultivo fueron 37°C con 5 % de CO₂ en aire y 100% de humedad relativa. Se realizó un cambio de medio cada día de por medio. Cuando se obtenía un confluencia celular máxima de 75%, se procedió al lavado de las células con solución de buffer de fosfatos (PBS) de 149.2 mM, pH: 7.3, y se desprendieron las células con ayuda de una solución de tripsina-EDTA 0.025%-0.03% respectivamente (v/v) durante 5-8 minutos en incubadora a 37°C.

3. Se realizó extracción de ADN a partir sangre periférica usando el kit Ultraclean Isolation Kit® Mobio. Posteriormente se realizó PCR usando los primers descritos por Fanganiello *et al.*(75), para la amplificación de un fragmento de 386 pb del gen FGFR2 que permitió determinar la presencia de la isoforma *FGFR2IIIc* (Primer forward: 5'-agtgtgtcccatctgacaag-3' y Primer Reverse: 5'-atagaattaccgccaagcac-3') (21). Las condiciones de amplificación incluyeron 35 ciclos de amplificación y una temperatura de anillaje de 58°C. Los productos fueron revelados en un gel de agarosa al 2,0%

usando un marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific® Life Technologies).

Para establecer la presencia de la mutación de los pacientes, se procedió en el primer paciente a partir de una densidad de 1×10^6 células del cultivo celular (Código: 004), así como en dos cultivos control que se emplearon para la determinación de la presencia de la mutación C758G (p. 253P>R) del receptor del factor de crecimiento fibroblástico tipo II (FGFR2). Teniendo la densidad celular necesaria, se realizó extracción de DNA a partir de lisado mediante *DNA Quick* (Zymo®) según condiciones del fabricante y su cuantificación se realizó por Nanodrop (Thermo scientific®). Para el restante de los pacientes 008, 012 y el control 006 se procedió a la extracción de DNA a partir de sangre periférica mediante el Kit *UltraClean DNA Isolation Kit* (MoBio®) según indicaciones del fabricante y su cuantificación se realizó por Nanodrop (Thermo scientific®).

A partir de una concentración de DNA de $150 \text{ ng}/\mu\text{l}$, se procedió a la amplificación de un fragmento de 367pb ubicado en el exón 7, empleando los primers *Forward*: 5'-TGACAGCCTCTGACAACAAC-3' y *Reverse*: 5'-GGAAATCAAAGAACCTGTGGC-3' a una concentración de $0.4 \mu\text{M}$, en Buffer 1X; 2 mM MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ dNTPs, y 1.25 U Taq DNA Polimerasa (Invitrogen®), bajo las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de denaturación inicial a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min; 35 ciclos de: denaturación a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 segundos; anillamiento a $62 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 segundos y extensión a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 segundos; finalmente, un ciclo de extensión final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. El volumen de reacción fue de $25 \mu\text{l}$ y la visualización se realizó en geles de agarosa al 2.0 % teñidos con *SYBRsafe* (Invitrogen®).

Al obtener suficiente concentración del fragmento amplificado, la determinación mutacional se realizó mediante la técnica RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), con la enzima de restricción BglII (Mutación P253R) y MboI (Mutación S252W) (Fermentas®) bajo un volumen de reacción de $15 \mu\text{l}$, con Buffer 1X, $6 \mu\text{l}$ de fragmento de PCR anterior y 3U de enzima. Esta mix se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 80

minutos, y su producto fue visualizado en geles de poliacrilamida al 9%, teñidos poscorrida con SYBRsafe (Invitrogen®). La longitud de los fragmentos fue evaluado empleando el Hyperladder de 25bp ((Thermo Scientific® Life Technologies).

4. A partir de los cultivos de los pacientes con síndrome de Apert, que se mantuvieron bajo condiciones de CO₂ y temperatura como las reportadas por Baroni et al (66) se procedió a dividir la población celular en dos brazos de trabajo: el primero, sin la administración de ELAPRASE® y el otro, con la administración del medicamento a las réplicas biológicas de las muestras.

4.1 Ensayos de densidad celular y de linealidad celular: Para conocer la densidad celular apropiada para realizar los ensayos será necesario realizar un ensayo de linealidad celular en los cultivos celulares. Para esto, se evaluarán por triplicado diferentes densidades desde 500 a 30,000 células por pozo en un volumen constante de 100µL en cajas de microtitulación de 96 pozos. Al cabo de 24 horas de incubación se realizará un cambio con medio DMEM suplementado con Suero fetal Bovino al 10% y antibiótico tipo Penicilina/Estreptomicina al 1%; y después de 48 horas, las placas fueron sometidas a tinción con Resazurina (4.4 µM) y leídas a una longitud de onda de 530nm_{ex} y 590nm_{em} en un lector de placas TECAN GENios para establecer el rango de relación lineal entre la densidad celular y la absorbancia. Luego, para cada línea se calculó la densidad celular correspondiente a un valor de absorbancia cercano a la unidad de 530 nm, que en adelante se empleará como la densidad celular de trabajo.

4.2 Determinación de la citotoxicidad causada por el Fármaco Elaprase® en los cultivos primarios: Los ensayos se realizaron en placas de cultivo de 48 pozos, donde se sembró una concentración de 30.000 células por pozo (valor previo obtenido en el ensayo de linealidad celular) en un volumen de 200 µL/pozo de DMEM suplementado, y fueron incubadas 24 horas para permitir la adhesión celular. Luego, para valorar el efecto citotóxico del fármaco, se prepararon cinco diluciones del rango del orden milimolar(mM). Cada pozo fue tratado con 200 µL de cada una de las diluciones, dejando un grupo de pozos no tratado como control de crecimiento, un grupo de pozos sin células como blanco de tratamiento

y como control positivo se empleó Taxol (1 μ M), un agente antitumoral con actividad apoptótica que desestabiliza la formación de microtúbulos e induce la detención de la división celular entre las fases G₂-M. Después del tratamiento de 24 horas se determinó la población celular viable mediante el ensayo de Resazurina y después de 24 horas se valoró la recuperación celular post-tratamiento empleando el mismo ensayo con el fin de determinar el efecto citotóxico del compuesto a partir de las curvas de concentración Vs. Porcentaje de supervivencia.

Después de calcular los porcentajes de supervivencia celular, relativos a las células control (tratadas sólo con medio), se construyó una curva de respuesta y se intentó calcular las concentraciones inhibitorias 50 (IC-50) del tratamiento, para cada cultivo celular, empleando una regresión no lineal en el programa estadístico GraphPad–Prism 6[®] (GraphPad Software, USA). Cada tratamiento se realizó por triplicado y se realizaron dos experimentos independientes en semanas diferentes.

Finalmente, con el fin de imitar el estado de activación del receptor de FGFR2 mutado, se sembraron en cajas de 6 pozos 80.000 células por pozo en 1.600 μ L de medio DMEM suplementado con FGF2 (0,069ng/uL) durante 24 horas, posterior a esto se retiró el medio de cultivo de los pozos que serían destinados a tratamiento con Elaprase[®] y se les agregó DMEM suplementado más Elaprase[®] a una concentración de 0.025mg/ml según lo reportado en la literatura (76), dado que no existieron diferencias con las diferentes concentraciones usadas en el ensayo inicial para determinar citotoxicidad. Los pozos que sirvieron de control se dejaron solo con DMEM suplementado. Las células fueron incubadas durante 48 horas para proceder a la extracción de RNA total.

4.3 Determinación de inmunofenotipo por epi-inmunofluorescencia: Una alícuota promedio de 40.000 Células de cada una de los cultivos celulares se sembraron

en placas diseñadas para este proceso con carga negativa en superficie para facilitar adherencia. Pasadas 24 horas, ya adheridas las células a la lámina, se fijaron con Paraformaldehído al 4% (vol/vol) en PBS y se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100 (vol/vol) en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente; se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno, y se adicionó, para mitigar la auto-fluorescencia presente, una solución de Cloruro de Amonio (NH₄Cl₂) 50mM y 0.1M de Glicina en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizarse tres lavados con PBS, de 5 minutos cada uno, a las células se les adicionó *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) (0.1µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz, se realizaron dos lavados con PBS por 5 minutos, y seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal *Anti-Fibroblast activation protein, alpha* (5 µg/ml; AB28244: Abcam®) en PBS-Albumina 1% durante 1 hora a 37°C, protegidas de la luz, este anticuerpo es específico para una proteína fibroblástica. Se sometieron las láminas a tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario policlonal IgG generado en cabra, anti-conejo, conjugado con FITC® (10mg/ml; AB6717: Abcam®) en PBS-Albumina 1% permitiendo su incubación por 60 minutos en cámara húmeda a 37°C protegido de la luz. Después de tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno, las láminas cubreobjetos fueron montadas en láminas portaobjetos, invirtiéndolas, adicionando Glicerol al 70% y sellando los bordes con resina; y visualizadas en un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1, Software EZ-C1. Ver. 3.90.

5. Extracción de RNA total: El RNA total de cada uno de los cultivos expuestos a 48 horas de tratamiento se extraerá usando el kit de extracción lisis celular-purificación de RNA libre de DNA por columnas *RNeasy® Mini kit* (74104: Qiagen®) según condiciones del fabricante; posteriormente, el RNA total obtenido de las muestras se cuantificará por *Qubit® RNA Assay Kit* (Q32852: Invitrogen®) y se almacenará a -80 °C hasta iniciar el proceso de retrotranscripción y posterior marcaje. La pureza e integridad del RNA usado fueron evaluadas usando el *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Todo el material plástico empleado en la extracción será material certificado como libre de RNAsas y pirógenos o en su defecto

material nuevo tratado con DEPC (dietilpircarbamato) al 0.1% para eliminar las nucleasas. Igualmente, el agua empleada para la elución del RNA de cada una de las muestras será tratada con DEPC y posteriormente esterilizada por calor. A partir de cada muestra con o sin tratamiento se realizarán dos replicas biológicas y dos replicas técnicas.

6. Para el análisis de los perfiles de expresión génica se escogió el *Array GeneChip Human Gene ST 2.0 (Whole transcriptome, Affymetrix®)* dado el alcance sobre transcriptoma completo (~46.000 transcritos). El proceso metodológico se llevó a cabo de acuerdo a instrucciones del fabricante con el kit *GeneChip Whole Transcript PLUS reagent Kit*. Para el proceso inicial se usaron aproximadamente 2 μ g de RNA de cada muestra (Con y sin tratamiento) con una concentración inicial >50ng/ μ L y con un RIN score de integridad >7. El cDNA sense inicial fue fragmentado y marcado con biotina empleando TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) y usando el kit *GeneChip WT Terminal labeling*. Aproximadamente 5.5 μ g de *DNA target* marcado fue hibridizado al GeneChip a 45°C por 16 horas. Los arrays hibridizados fueron lavados y teñidos con estreptavidina – ficoeritrina en la estación de fluídica para GeneChip 450 y escaneados en el Escáner GCS3000 (Affymetrix). Los valores de señal fueron computados usando el software *GeneChip™ Comand Console®*.

7. Para la comprobación de la expresión génica diferencial, a partir de una cantidad cercana a los 200 ng de ARN total se realizó el proceso de retrotranscripción con el kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*(Invitrogen®) y el cADN resultante se usó para el desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para la determinación de los cambios en la expresión génica de genes de interés identificados en el análisis de Microarray relacionados con el componente de Matriz extracelular por el diseño del experimento y el proceso molecular de proliferación celular como objeto de interés en la fisiopatología de la enfermedad. Los primers fueron diseñados usando el programa Primer 3 (versión 0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (**Tabla 2**). GAPDH fue usado como gen referencia para normalizar los datos de los genes evaluados. Las reacciones fueron realizadas en el equipo *Lighcycler 96* (Roche) utilizando *SyberGreen Master Mix* (Applied Biosystems). Todos los ensayos fueron

realizados por triplicado y con mínimo dos réplicas por ensayo para estimar la variación. Los niveles de expresión se determinaron mediante cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ (Doble delta Ct). Los datos fueron expresados como las veces de expresión en las células tratadas versus las células sin tratamiento.

Tabla 2. Secuencia de primers usados en experimentos de qRT-PCR

GEN	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
FGFBP3	AGGCACTGCAGTCTCCAAC	TAATTGCACCACTGCTCCAG
MMP1	GGTCTCTGAGGGTCAAGCAG	AGTTCATGAGCTGCAACACG
CDH3	AACCTCCACAGCCACCATAG	GTCTCTCAGGATGCGGTAGC
PTPRB	TGGGAACAAAACGTTCAAA	TGCATCAAGCTGTTCTCAC
GADPH	CACCAGGGCTGCTTTAACTCTGGTA	CCTTGACGGTGCCATGGAATTTGC

4.3. Fase post analítica.

4.3.1. Análisis de datos: el análisis de datos, incluyendo el análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

- Según directrices obtenidas durante la pasantía en las instalaciones de la Fundación pública de Medicina Xenómica se obtuvieron los datos crudos que fueron extraídos automáticamente usando el protocolo de extracción de datos incluido en el software. Después de importar los archivos CEL, los datos fueron resumidos y normalizados usando el método de RMA implementado en el software Affymetrix® Expression Console™ Software (EC).
- Se exportaron los resultados usando el análisis de RMA de nivel de gen y se realizó el protocolo para la determinación de genes diferencialmente expresados (DEG). La estadística básica de los datos se llevó a cabo mediante

las diferencias de expresión determinada usando “fold change” y componentes principales. Para cada set DEG, el análisis jerárquico de clusters fue realizado usando “*complete linkage and Euclidean distance*” como medidas de similitud. El análisis de enriquecimiento de genes y de anotación funcional fue realizado usando DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

- A cada término le fue asignado un *score* (EASA), que consiste en el *p-value* modificado por el Test Exacto de Fisher. Si el valor era menor a 0.05 fue clasificado como enriquecimiento. Todos los análisis de datos y visualización de los genes expresados diferencialmente fueron realizados usando R 3.1.2 (www.r-project.org). Los genes obtenidos en las anotaciones funcionales fueron agrupados en clusters y se seleccionaron aquellos que presentaron un *fold change* de $|2|$ y un *p* valor significativo. Las correcciones del *p* valor para la significancia estadística de los hallazgos fue realizada con los test de Bonferroni, y Benjamini.
- Para complementar el análisis de los datos del Microarray se analizaron diferencias significativas en la expresión por el paquete *Significance analysis of microarrays (SAM)* el cual establece mediante el método de permutación la posibilidad de falsos descubrimientos (FDR).
- Se estableció la presencia de relaciones jerárquicas entre los distintos genes encontrados con expresión diferencial, los cuales se agruparon en un mapa de calor (Heat Map) de acuerdo a la similitud de sus perfiles de expresión usando el paquete estadístico R 3.1.2 (www.r-project.org).
- Para el análisis de los datos de las RT-PCR, se emplearan los valores de las medias y los Errores Estándar de la Media (SEM), junto con sus intervalos de

confianza. Las variaciones entre los grupos se compararon empleando t de Student.

4.3.2. Análisis bioinformático:

- Para la verificación de los módulos de asociación encontrados se hizo un análisis con la herramienta DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery: <http://david.abcc.ncifcrf.gov> para verificar la calidad de las asociaciones.
- El análisis funcional de los distintos genes se realizó mediante la base de datos del Gene Ontology (NCBI) y se correrán los datos en los parámetros de la base de datos de KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes para la generación de las vías moleculares que se encuentren alteradas.
- Los genes de interés que representen las vías moleculares objeto de estudio se analizaron en las bases de datos STRING (<http://www.string-db.org>) y PINA2 (Protein interaction Network Analysis plataforma) (<http://cbg.garvan.unsw.edu.au/pina/interactome>) para establecer las interacciones proteicas potenciales y las vías celulares relacionadas.

5. Resultados:

5.1. Establecimiento de cultivos celulares:

Durante el tiempo de ejecución del proyecto, se lograron establecer con éxito 7 cultivos celulares, siendo tres pertenecientes a pacientes con SA: Paciente 1 YPM (Rotulado con código: 004), paciente 2 KLTG (Rotulado con código: 008), paciente 3 SAOM (Rotulado con código: 012) y un control sano (Rotulado con código: 006). Fueron usados igualmente el cultivo de 2 pacientes sanos adicionales (002 y 014) en el desarrollo de los experimentos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Cultivos celulares establecidos

NUMERO CULTIVO CELULAR ASIGNADO	FECHA ESTABLECIMIENTO CULTIVO	FECHA DE PRIMER PASE	OBSERVACIONES
001	08-08-2014	16-08-2014	Se descarta. Muestra invalida posterior a tripsinización.
002	18-08-2014	02-09-2014	Usada para experimentos iniciales.
003	09-08-2014	16-10-2014	Se descarta.
004	30-08-2014	02-09-2014	Usado en experimentos, corresponde a paciente 1. Proceso de congelamiento y descongelamiento invalido. No se cuenta con muestra
005	17-08-2014	20-10-2014	No fue posible obtener densidad celular deseada.

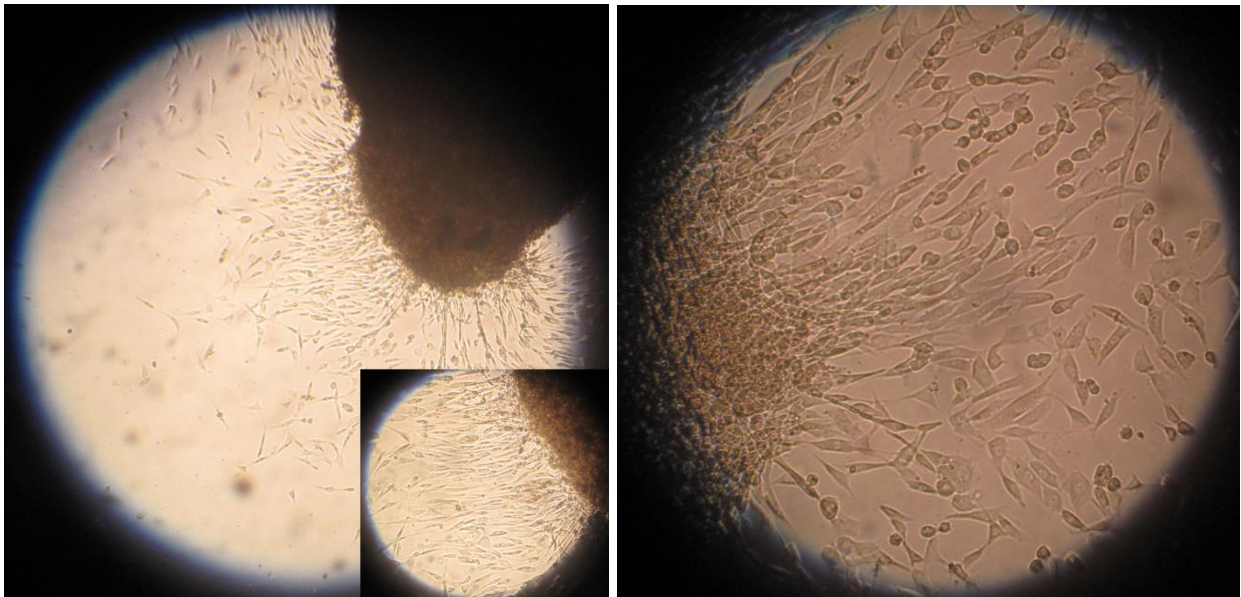
006	19-12-2014	24-12-2014	Usado como control basal de los experimentos. Proceso de congelamiento y descongelamiento invalido. No se cuenta con muestra
007	No establecido	-----	Muestra no prolifera a 4 semanas de observación
008	07-04-2015	19-04-2015	Usado en experimentos, corresponde a paciente 2
009	No establecido	-----	Corresponde a controles sanos que se requiere para calibración de metodología de mediciones bioquímicas sobre tejido. Muestras no proliferan a 4 semanas de observación
010	No establecido	-----	
011	No establecido	-----	
012	24-11-2015	01-12-2015	Corresponde a paciente 3
013	13-12-2015	06-01-2016	Corresponde a control sano, muestra de cráneo de adulto, que se requiere para calibración de metodología de mediciones bioquímicas sobre tejido.
014	10-01-2016	28-01-2016	Corresponde a control sano, muestra de cráneo de niño, que se requiere para calibración de metodología de mediciones bioquímicas sobre tejido.

5.2 Morfología celular:

Las células obtenidas por explante del periostio de las suturas coronales en los cultivos establecidos de los pacientes con SA presentaron una morfología de tipo

fibroblastoide de manera homogénea en la población celular (**Figura 7**), su crecimiento fue lento a partir del explante y antes del primer pase (Hasta 6 semanas) y antes del pase 10 entraban rápidamente en estado de senescencia, además su viabilidad después del pase 5 no fue adecuada. La morfología fibroblastoide observada fue una característica indispensable para emplearse como modelo *in vitro* en la evaluación de la acción del fármaco Elapraxe®.

Figura 7. Observación microscópica de la Morfología celular

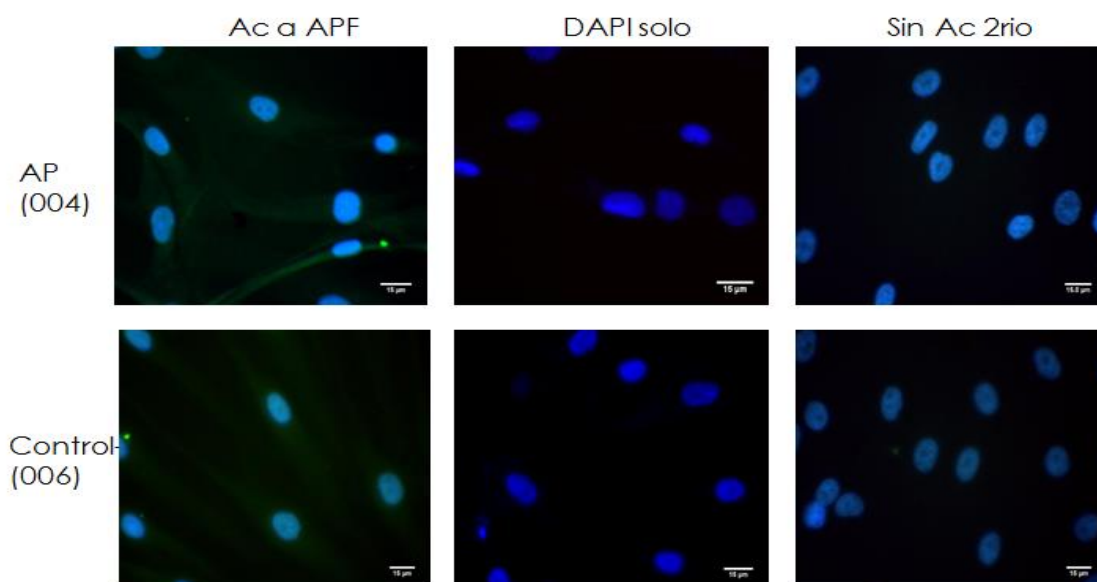


Observación microscópica aleatoria de expansión celular en primeros pases de cultivo celular primario de fibroblastos de periostio humanos Cultivo 004. Se realizó una visualización a 10X (imagen izquierda) y en algunos casos se realizó énfasis de observación 40X (Imagen inferior izquierda e imagen derecha). Fecha: Agosto/2014

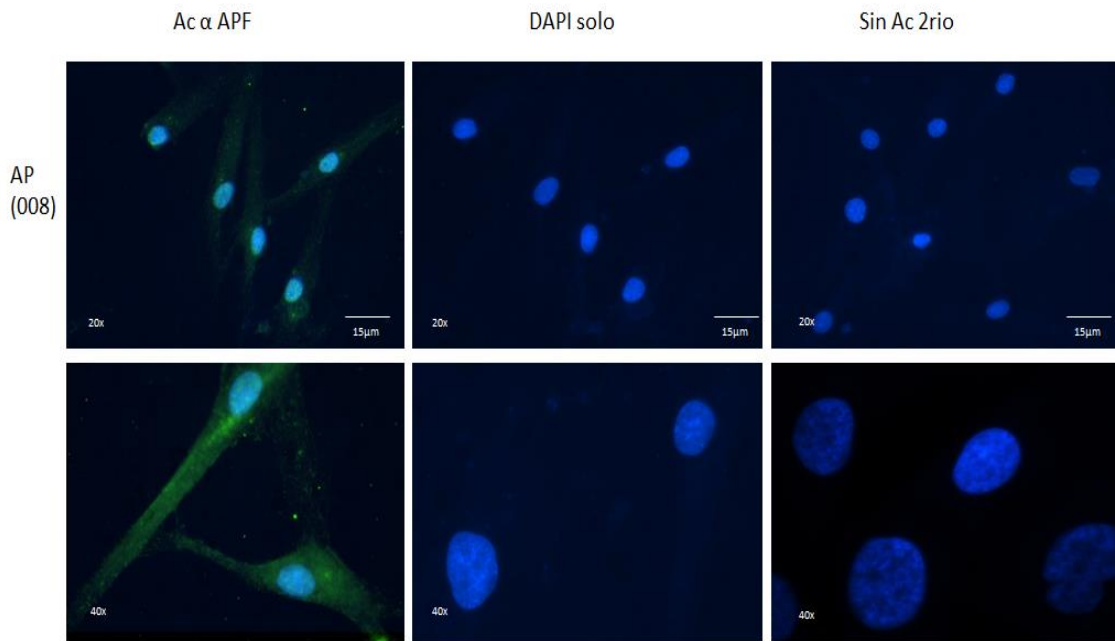
5.3 Resultados epi-inmunofluorescencia:

El proceso de tinción con el anticuerpo AFP usado en la epi-inmunofluorescencia, muestran la presencia de una población exclusiva de fibroblastos sin presencia de contaminación o de otras poblaciones celulares (**Figura 8 A-B-C**) además de la morfología fibroblástica evidenciada a la observación microscópica.

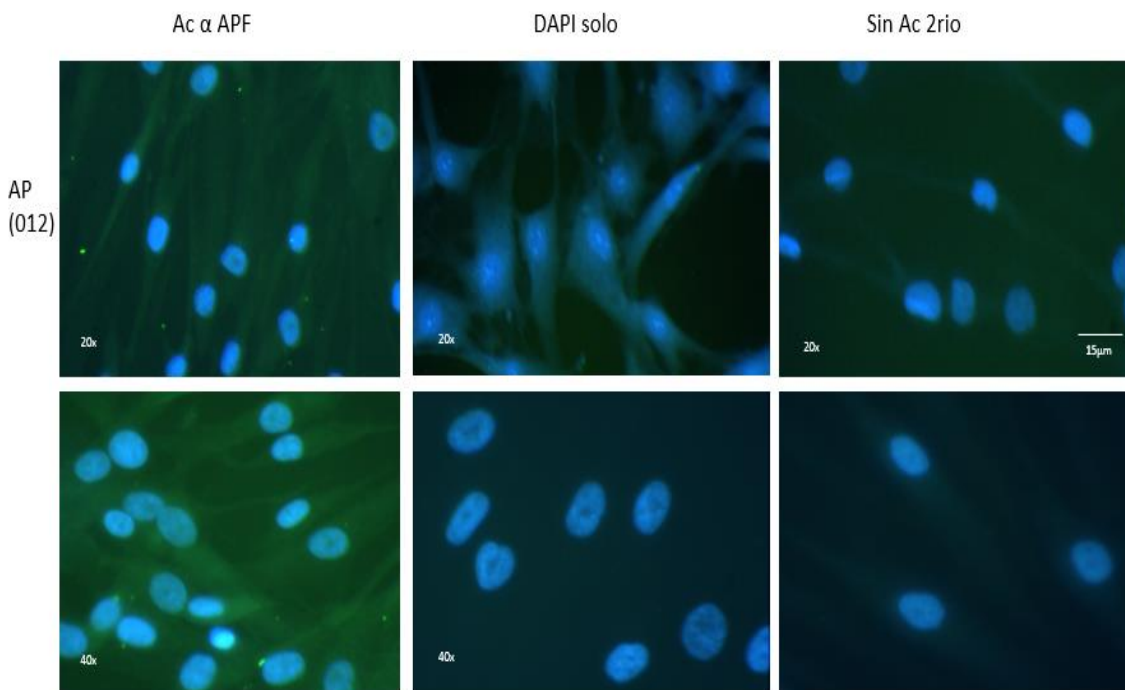
Figura 8. Imágenes de Epi-inmunofluorescencia



A. Tinción específica con Ac AFP en paciente 004 versus paciente control 006. Visualización a 40x



B. Tinción específica con Ac AFP en paciente 008. Visualización a 20x y 40x



C. Tinción específica con Ac AFP en paciente 012. Visualización a 20x y 40x

5.4 Presencia de isoforma mesenquimal del receptor (FGFR2IIIC) y perfil mutacional de los pacientes:

Se observó la expresión de la isoforma del receptor *FGFR2IIIC* en el ensayo de evaluación mediante PCR en todas las muestras (**Figura 9**). El análisis mutacional de los pacientes incluidos en el estudio reveló que 2/3 (66%) presentaban la mutación S252W y el 1/3 restante (33%) presentaba la mutación P253R lo que corresponde con lo reportado en la literatura. El patrón electroforético discriminante para la mutación p.253P>R o p.252S>W en FGFR2 para muestras evaluadas se observa en la **Figura 10 A-B-C**. El análisis mutacional fue plasmado en la **tabla 4**.

Figura 9. Presencia de la isoforma del receptor FGFR2IIIC (Mesenquimal).

Gel que visualiza la amplificación de un fragmento de 286pb que corresponde a la expresión de la isoforma mesenquimal *FGFR2IIIC*. Carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a muestras de control positivo y pacientes con tratamiento con Idursulfase, los carriles 2,4,6 y 8 corresponden a muestras sin tratamiento y el carril C- a control negativo.

Figura 10. Patrón electroforético de mutaciones en FGFR2 en pacientes SA.

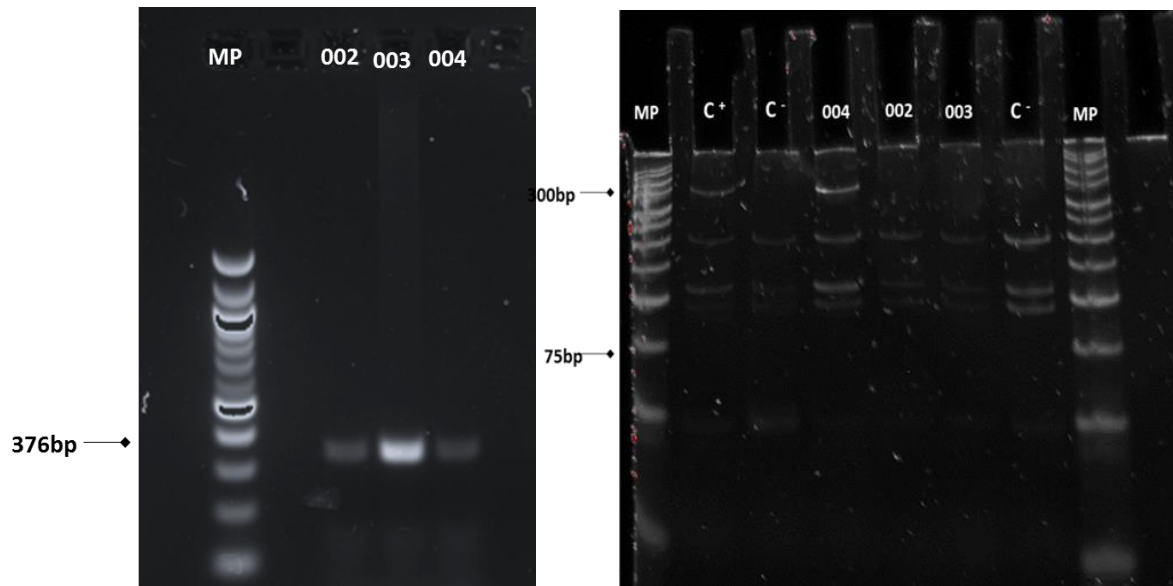


Figura 10A. Perfil mutacional de tres cultivos celulares fibroblásticos con la enzima BglI. Amplificación del fragmento ubicado en el exón 7 de FGFR2 (376pb) en tres muestras de ADN proveniente de los cultivos celulares evaluados (Gel a la izquierda). Perfil de restricción de la enzima BglI para la detección de la mutación P253R en geles de poliacrilamida al 9%, la muestra del paciente 1 es positivas para la mutación P253R y por lo tanto presenta una banda de bajo peso molecular (± 300 bp) (Gel a la derecha). MP: Marcador de peso; C⁺: Muestra control positiva para la mutación; 002-004: muestras cultivo celular, 004 corresponde al cultivo del paciente 1 (AP1); C⁻: DNA negativo de la mutación.

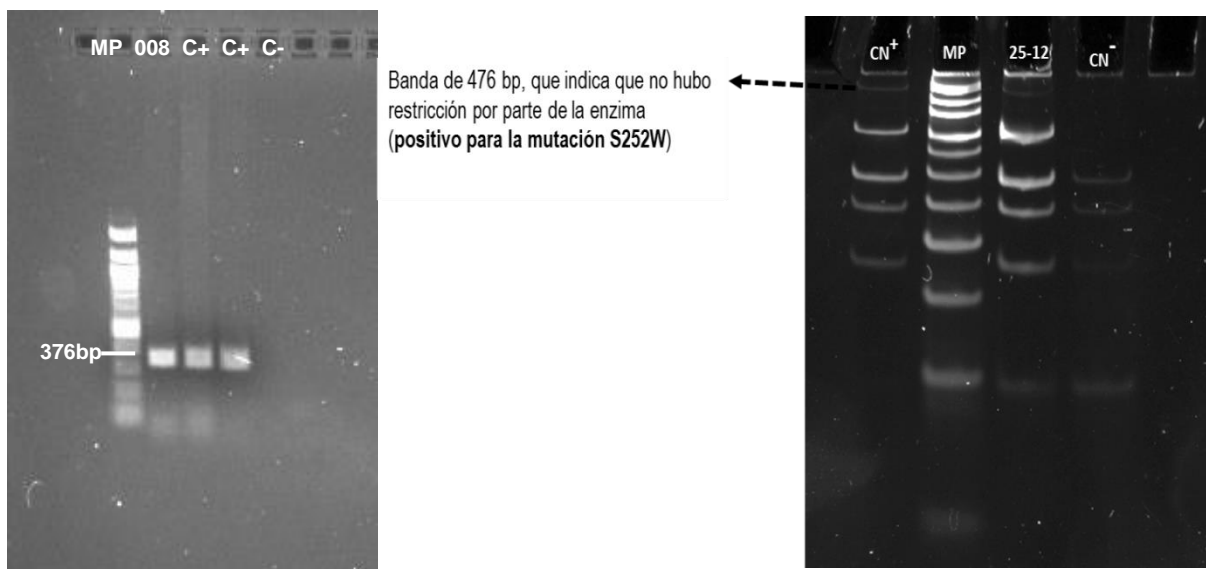


Figura 10B. Perfil mutacional en una muestra de sangre con la enzima Mbol. Amplificación del fragmento ubicado en el exón 7 de FGFR2 (376pb) en ADN proveniente de muestra de sangre de Paciente 2 (AP2) rotulada como cultivo 008 y controles positivos propios (Gel a la izquierda). Perfil de restricción de la enzima Mbol para la detección de la mutación S252W en geles de poliacrilamida al 9%. Se observa una banda en 476pb que indica la presencia de la mutación (Gel a la derecha). MP: Marcador de peso; C+: Muestra control positiva para la mutación; 25-12: muestra de DNA de paciente 2; C-: DNA negativo de la mutación.

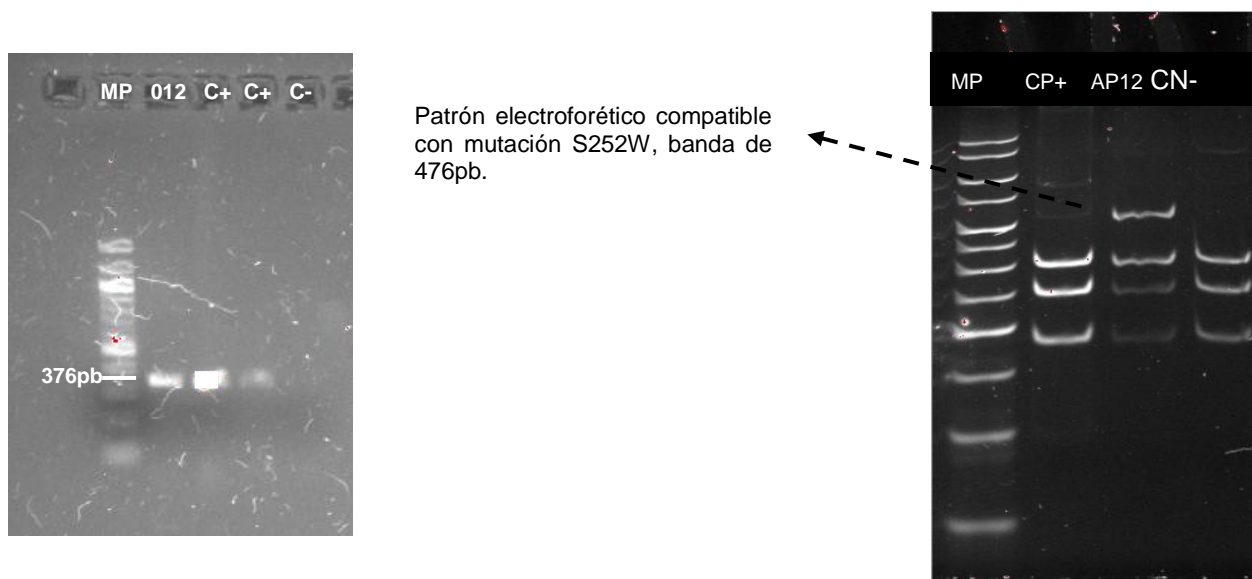


Figura 10C. Perfil mutacional en una muestra de sangre con la enzima Mbol. Amplificación del fragmento ubicado en el exón 7 de FGFR2 (376pb) en una muestra de ADN proveniente de paciente 3 (AP3) rotulado como cultivo celular 012 y controles positivos propios (Gel a la izquierda). Perfil de restricción de la enzima Mbol para la detección de la mutación S252W en geles de poliacrilamida al 9%, Se observa una banda en 476pb que indica la presencia de la mutación (Gel a la derecha). MP: Marcador de peso; C+: Muestra control positiva para la mutación; AP12: muestra cultivo celular 012, paciente 3; C-: DNA negativo de la mutación.

Tabla 4. Análisis mutacional realizada sobre los cultivos establecidos

Número Cultivo Celular	Análisis mutacional asociado a AS del "Receptor 2 del Factor de Crecimiento"
------------------------	--

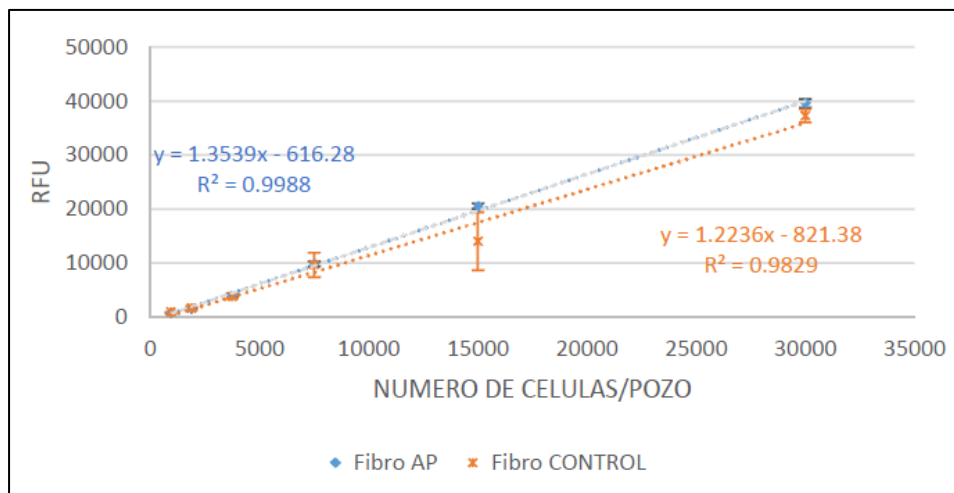
	Fibroblástico" (FGFR2).
001	No analizado. Se descartó la muestra por invalidad.
002	Negativo para la mutación P253R
003	Negativo para la mutación P253R
004	Positivo para la mutación P253R
005	Negativo para la mutación P253R
006	Negativo para la mutación P253R
007	No establecido
008	Positivo para la mutación S252W
009	No establecido
010	No establecido
011	No establecido
012	Positivo para la mutación S252W

5.5 Ensayo de linealidad celular:

Se observó mediante un análisis de regresión lineal un incremento directamente proporcional en la reducción de Resazurina al aumentar la densidad celular sembrada por pozo de manera significativa. La **figura 11**, indica un fuerte grado de correlación existente ($R^2 > 0.98$), indicando un ajuste alto al modelo de regresión lineal, entre las variables de número de células sembradas y la respuesta en unidades relativas de fluorescencia (URF). Este regresión no es dependiente de la carga mutacional del cultivo. De otra parte, con microscopio invertido se estableció que la densidad de 80.000 células/pozo presenta un estado de confluencia cercano al 80%, 72 horas después de la inoculación (24 horas de incubación previa a la adición

del fármaco más 48 horas de exposición), razón por la cual esta es la densidad escogida para realizar experimentos subsecuentes, debido a que es necesario mitigar la variación de los resultados por desprendimiento de la monocapa celular.

Figura 11. Ensayo de densidad celular



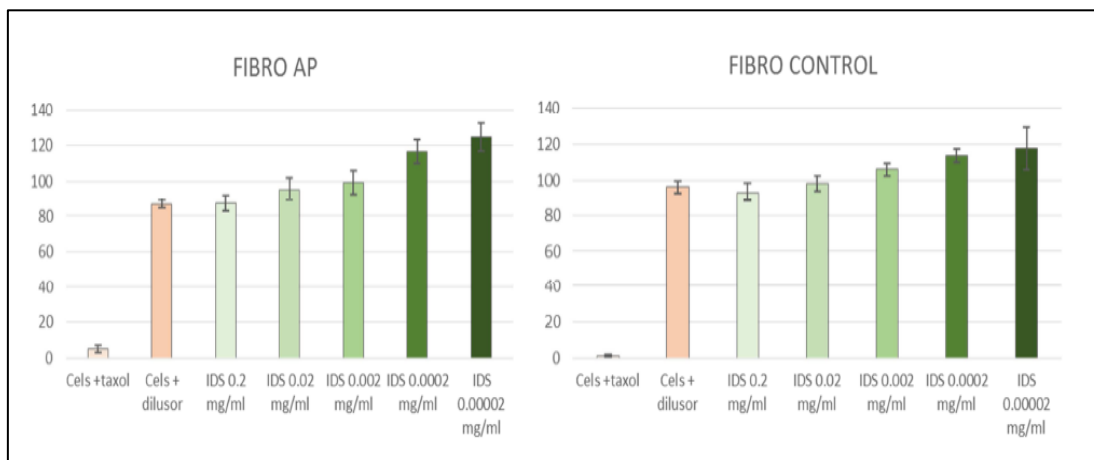
Intensidad de la fluorescencia media (URF) al evaluar seis densidades celulares en los cultivos FIBRO CONTROL y FIBRO AP (Fibroblastos APERT) durante un periodo de 48 horas.
n=6

5.6 Citotoxicidad ocasionada por el fármaco Elaprase®:

No se observó un efecto citotóxico aparente a las 48 horas pos-tratamiento en los cultivos celulares expuestos al fármaco Elaprase®. Este comportamiento difiere al encontrado con Taxol que muestra una tasa de mortalidad celular del 90% (**Figura 12**). Indirectamente se observó que al disminuir la concentración de la enzima recombinante aumenta la densidad celular frente a las células sin tratamiento (Figura Suplem. 2) lo que podría representar un efecto proliferativo indirecto no dependiente de la carga mutacional.

La cuantificación del RNA total postratamiento mostro integridad (RIN score >6) y concentraciones por encima de 50ng/uL en todas las muestras (**Tablas 5-7**) la cual se encuentra dentro del rango necesario aceptado para comenzar el ensayo de hibridación para el *microarray*. Se evaluaron 3 réplicas biológicas (Rb) (Rotuladas como: Rb1, Rb2 y Rb3) por paciente y sin tratamiento y con el tratamiento enzimático a evaluar (ST: sin tratamiento, E: con Elapraxe®).

Figura 12. Ensayo de Citotoxicidad



Curvas de supervivencia de los cultivos celulares FIBRO AP y FIBRO CONTROL. Las células se sembraron a una densidad de 30000 (cels/pozo) en cajas de cultivo de 48 pozos. 24 horas después, las líneas celulares FIBRO AP (Izquierda), y FIBRO CONTROL (Derecha) se sometieron a exposición del fármaco Elapraxe® en diferentes concentraciones (0.2, 0.02, 0.002, 0.0002 y 0.00002 mg/ml). Se realizó lectura 48 post-tratamiento por el método de viabilidad con Rezasurina. Este experimento se realizó por duplicado. Como controles se empleó células sin tratamiento; pozos vacíos sin células, y como control positivo (muerte), células sometidas a Taxól ($4 \times 10^{-1} \mu\text{M}$).

Tabla 5. Cuantificación RNA muestras cultivos 004 y 006

Muestra	Concentración	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
004 rb1 st	264,8	ng/μl	6,621	3,175	2,09	1,04
004 rb1 e	338,7	ng/μl	8,469	4,076	2,08	1,27
004 rb2 st	327,2	ng/μl	8,181	3,949	2,07	2,01
004 rb2 e	342,7	ng/μl	8,568	4,144	2,07	1,7
004 rb3 st	195,5	ng/μl	4,887	2,349	2,08	0,57
004 rb3 e	196,4	ng/μl	4,909	2,388	2,06	1,83
006 rb1 st	135,9	ng/μl	3,399	1,59	2,14	0,2
006 rb1 e	113,8	ng/μl	2,845	1,372	2,07	0,58
006 rb2 st	161,9	ng/μl	4,047	1,926	2,1	0,3
006 rb2 e	128	ng/μl	3,201	1,533	2,09	0,41
006 rb3 st	184,6	ng/μl	4,616	2,24	2,06	1,4
006 rb3 e	185,2	ng/μl	4,631	2,22	2,09	0,49

A 260: Absorbancia a 260nm de longitud de onda; A280: Absorbancia a 260nm de longitud de onda. 260/280: Relación entre longitud de onda a 260 y 280. Rb1, 2 y 3 st: replicas biológicas 1, 2 y 3 de cultivos sin tratamiento; Rb1, 2 y 3 e: replicas biológicas 1, 2 y 3 de cultivos con tratamiento con Elapraxe®.

Tabla 6. Cuantificación RNA muestras cultivos 008

Muestra	Concentración	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
008 rb1 st	230,7	ng/μl	3,275	2,278	2,12	0,15
008 rb1 e	181,3	ng/μl	4,514	2,308	2,12	0,54
008 rb2 st	104,1	ng/μl	3,546	1,63	2,07	0,89
008 rb2 e	156,5	ng/μl	4,809	1,674	2,14	0,07
008 rb3 st	144,3	ng/μl	2,879	1,896	2,07	1,61
008 rb3e	124,9	ng/μl	2,965	4,042	2,22	0,05

A 260: Absorbancia a 260nm de longitud de onda; A280: Absorbancia a 260nm de longitud de onda. 260/280: Relación entre longitud de onda a 260 y 280. Rb1, 2 y 3 st: replicas biológicas 1, 2

y 3 de cultivos sin tratamiento; *Rb1*, 2 y 3 e: replicas biológicas 1, 2 y 3 de cultivos con tratamiento con Elapraxe®.

Tabla 7. Cuantificación RNA muestras cultivos 012

Muestra	Concentración	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
012 rb1 st	63,35	ng/μl	8,475	1,028	5,68	0,47
012 rb1 e	229,23	ng/μl	6,423	2,54	2,07	1,07
012 rb2 st	136,23	ng/μl	4,123	1,341	2,08	0,5
012 rb2 e	75,28	ng/μl	3,762	3,76	2,06	1,19
012 rb3 st	63,49	ng/μl	8,412	2,789	2,09	1,09
012 rb3 e	138,77	ng/μl	7,31	3,341	2,16	0,26

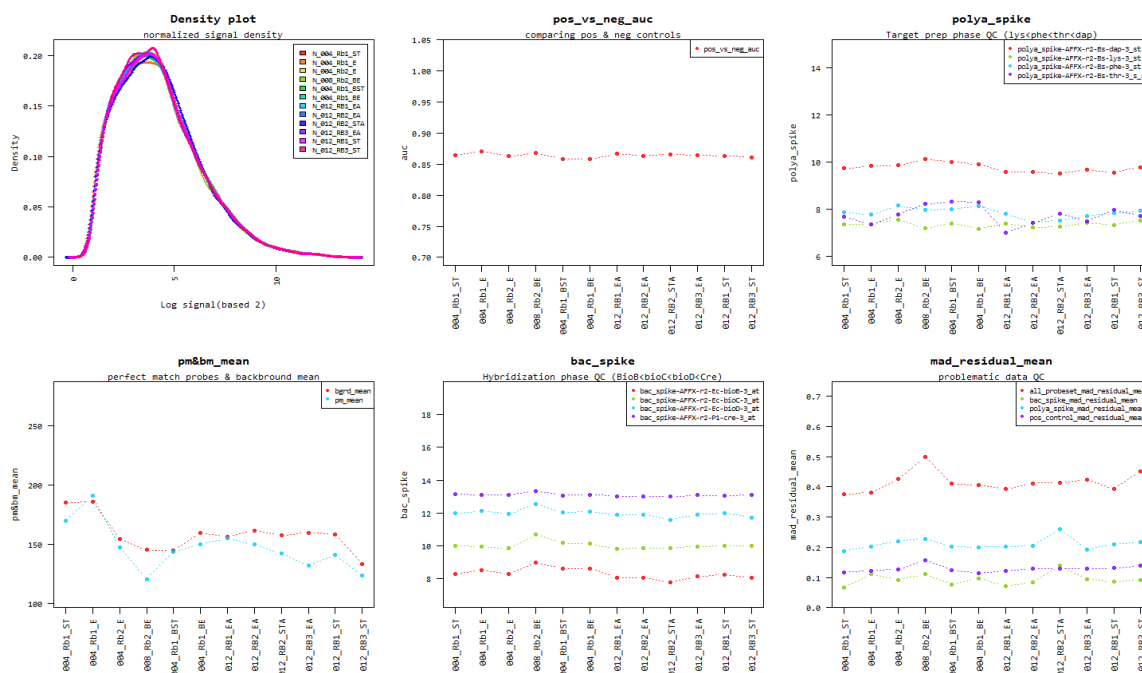
A 260: Absorbancia a 260nm de longitud de onda; A280: Absorbancia a 260nm de longitud de onda. 260/280: Relación entre longitud de onda a 260 y 280. *Rb1*, 2 y 3 st: replicas biológicas 1, 2 y 3 de cultivos sin tratamiento; *Rb1*, 2 y 3 e: replicas biológicas 1, 2 y 3 de cultivos con tratamiento con Elapraxe®.

5.7 Expresión génica diferencial analizada por tecnología de Microarray:

Se estableció inicialmente la calidad de las muestras indispensable para proceder a la hibridación en el Genechip®. Todas las muestras se ajustaron a las métricas de calidad, las cuales deben interpretarse en cada experimento en el caso de tejidos biológicos como este. Se estableció como parámetro el agrupamiento similar de las muestras tanto para la intensidad de la señal para excluir errores en la lectura del escáner, como para el proceso de hibridación de las sondas y para el procesamiento de la muestra y de las sondas que indica un buen desempeño

en la técnica de laboratorio para la preparación de la muestra como lo observado en las muestras (**Figura 13**).

Figura 13. Métricas de calidad del Microarray evaluadas en las muestras



Métricas de calidad evaluadas en las muestras antes de proceder a la hibridación del Genechip®: agrupamiento en la densidad de señal, controles positivos y negativos de hibridación, hibridación de las sondas y background de la señal. 004: paciente 1, 008: paciente 2, 012: paciente 3. ST: muestras sin tratamiento, E: muestras con tratamiento con Elapraxe®.

Se encontraron 230 genes diferencialmente expresados (101 al alza y 119 a la baja) entre las muestras de los pacientes con y sin tratamiento (**Tabla 8, figura 14**). Para la generación de clusters de anotación, se agruparon los términos que compartieran un significado biológico similar y que compartieran set de genes. Al anotar los 230 genes diferencialmente expresados en las bases de datos de KEEG Pathway Database, Gene Ontology Database (AmiGO) y DAVID, se encontraron 218 transcritos con función conocida que se agrupan en las siguientes categorías funcionales (**Tabla 9**) biogénesis o componentes de matriz extracelular (52 genes), señalización intracelular (49 genes), respuesta inflamatoria (21 genes), **REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS (21 GENES)**, diferenciación celular (15 genes) y moléculas de unión a Glicosaminoglicanos (GAGs) (4 genes). Algunos de los genes están relacionados con más de una categoría funcional y a su vez estas categorías representan los clúster de mayor enriquecimiento.

Los genes de mayor relevancia en sus categorías funcionales fueron Componente celular: Matriz extracelular (up: *MMP3*, *TNXB*, *OTOL1*, *MMP1* - down: *ACAN*, *CDH3*, *CDH13*, *PCDH10*; *p value* 1,97E-44) (**Figura 15C**); en la siguiente categoría Proceso biológico: **Proliferación celular** (up: *FGF2* down: *MTRNR2L2*, *PTPRB*, *ATG9A*; *p value* 2,61E-06) (**Figura 15A**) y finalmente Función molecular: Unión a GAGs (down: *FGFBP3*; *p value* 7,48E-08) (**Figura 15B**).

En el análisis preliminar se observó que la mayoría de transcritos están asociados con la biogénesis y componentes de matriz extracelular (52/218; 24%). Teniendo en cuenta el impacto directo relacionado con el tratamiento propuesto en el trabajo, es posible que este componente celular este sobrerrepresentado (**Tabla 9**).

Tabla 8. Lista de genes y *Fold Change* en Microarray

Numero acceso	Símbolo	Nombre del gen	AP1	AP2	AP3	p value
NM_001005484	OR4F5	Olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 5	2,76	2,07	2,43	2,98E-04
NM_014357	LCE2B	Late cornified envelope 2B	2,18	2,12	2,96	1,41E-04
NM_002966	S100A10	S100 calcium binding protein A10	2,58	2,07	2,40	2,46E-03
NM_001164586	IGFN1	Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1	3,54	2,49	2,20	2,49E-03
NM_001178096	F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	18,20	7,96	5,43	3,70E-03
NM_001001827	OR2T35	Olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 11	2,87	2,26	2,74	7,81E-03
NM_024114	TRIM48	Tripartite motif containing 48	2,19	2,43	2,67	3,04E-02
NM_001004458	OR1S1	Olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 1	2,10	2,35	2,21	1,02E-02
NM_002422	MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	2,38	2,43	2,43	2,71E-03
ENST00000553087	KRT6C	Keratin 6C	2,24	2,04	2,36	1,02E-02
NM_002935	RNASE3	Ribonuclease, rnase A family, 3	2,57	2,47	2,60	1,99E-02
NM_003013	SFRP2	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2)	17,33	16,81	7,12	2,71E-13
NM_001145938	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	5,84	3,97	2,14	1,57E-20
NM_003554	OR1E2	Olfactory receptor, family 1, subfamily E, member 2	2,66	2,02	2,59	2,46E-04
NM_133475	ANKRD24	Ankyrin repeat domain 24	2,34	2,78	2,08	3,50E-04
NM_145276	ZNF563	Zinc finger protein 563	2,74	2,57	2,68	7,05E-03

NM_003014	SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4	2,78	2,54	2,75	5,60E-04
NM_138330	ZNF675	Zinc finger protein 675	2,03	2,38	3,06	8,09E-03
NM_005924	MEOX2	Mesenchyme homeobox	3,94	2,94	2,16	1,85E-08
NM_001079530	CFC1B	Cripto, FRL-1, cryptic family 1B	2,36	2,09	2,27	1,57E-07
NM_001142351	ST6GAL2	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2	2,31	2,04	2,21	2,46E-04
ENST00000429538	PAX8	Paired box 8	2,07	2,06	2,91	3,50E-06
ENST00000437310	OR5H14	Olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 14	2,96	2,76	2,87	2,46E-03
NM_003716	CADPS	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator	2,41	2,73	3,32	2,49E-03
NM_001302770	CSN2	Casein beta	2,58	2,94	2,91	9,63E-09
NM_019105	TNXB	Tenascin XB	2,06	3,77	3,03	0,0082787
ENST00000466254	TRBC2	T cell receptor beta constant 2	2,12	2,12	2,46	0,00381862
ENST00000408906	OR2A5	Olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 14	2,46	2,97	3,36	0,00620194
ENST00000390348	TRGV1	T cell receptor gamma variable 1	2,81	2,19	2,26	0,02531844
NM_000598	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	3,25	2,71	3,12	0,00643311
NM_006682	FGL2	Fibrinogen-like 2	2,92	3,38	2,31	0,00693147
NM_022573	TSPY2	Testis specific protein, Y-linked 2	2,01	2,70	2,56	0,00745442
AF111708	MSTO1	Misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator	2,19	2,28	2,49	0,00888039
ENST00000369175	FAM72C	Family with sequence similarity	2,71	2,16	2,33	0,02727223

		72, member C				
NM_001100	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	2,19	2,17	2,64	0,00174779
NM_001135241	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	2,21	4,03	2,68	0,00800633
NM_024114	TRIM48	Tripartite motif containing 48	2,11	3,56	2,42	1,59E-04
NM_001004739	OR5L2	Olfactory receptor, family 5, subfamily L, member 2	3,16	3,25	2,71	0,00165787
XR_432738	PRSS23	Protease, serine, 23	2,62	2,92	2,98	0,0034415
NM_001004740	OR5M1	Olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 1	2,31	2,64	2,10	0,04752524
NM_176890	TAS2R50	Taste receptor, type 2, member 50	2,01	2,70	2,09	3,30E-04
ENST00000390585	IGHD2-8	Immunoglobulin heavy diversity 2-8	2,14	2,56	2,26	8,68E-04
ENST00000390598	IGHV3-7	Immunoglobulin heavy variable 3-7	2,53	2,24	2,31	0,03039373
ENST00000469461	CATSPER2// LOC101930343	Cation channel, sperm associated 2//uncharacterized LOC101930343	2,27	2,49	2,10	0,04445651
NM_002986	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	2,11	2,32	2,16	9,63E-04
NM_001165252	KRTAP2-3	Keratin associated protein 2-3	2,78	3,06	2,33	0,02978834
NM_033059	KRTAP4-11	Keratin associated protein 4-11	2,91	3,12	2,13	0,00129305
NM_021013	KRT34	Keratin 34	2,58	2,22	2,35	0,00348018
NM_002522	NPTX1	Neuronal pentraxin I	2,44	2,05	2,88	0,0108257
NM_001143818	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	2,39	3,01	3,32	0,01240639
NM_001190441	LGALS16	Lectin, galactoside-binding, soluble, 16	2,08	2,86	2,04	0,0129595

NM_001289158	EMR3	Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	2,38	2,72	2,20	0,02707838
NM_181621	KRTAP13-2	Keratin associated protein 13-2	2,36	2,18	2,30	0,0496378
NM_001080440	OTOL1	Otolin 1	2,47	3,06	3,35	1,49E-05
ENST00000296575	HHIP	Hedgehog interacting protein	2,48	2,56	3,22	0,00217683
NM_144644	SPATA4	Spermatogenesis associated 4	2,65	2,66	2,53	0,00298018
NM_003536	HIST1H3H	Histone cluster 1, h3h	2,51	3,02	2,64	0,01008408
ENST00000377050	UBD	Ubiquitin D	3,15	3,04	3,37	0,01157834
NM_006900	IFNA13	Interferon, alpha 13	2,35	2,43	2,04	0,00981119
NM_176891	IFNE	Interferon, epsilon	2,59	2,38	2,44	0,00633825
ENST00000529915	LPXN	Leupaxin	2,64	2,09	2,90	0,00755223
NM_001882	CRHBP	Corticotropin releasing hormone binding protein	3,75	2,39	2,92	0,01082954
NM_001099850	LOC391003	PRAME family member-like	3,05	3,02	2,26	0,01981219
ENST00000369851	GNAI3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	3,09	3,01	2,78	0,03396304
NM_178354	LCE1F	Late cornified envelope 1F	2,15	2,69	2,17	1,86E-03
NM_020950	KIAA1614	Kiaa1614	3,03	2,33	2,12	7,01E-03
NM_001146344	PRAMEF11	PRAME family member 11	2,88	2,40	2,76	1,37E-07
NM_001289158	ADGRE3	Adhesion G Protein-Coupled Receptor E3	2,62	3,03	2,33	1,86E-03
NM_001001827	OR2T35	Olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35	2,48	3,00	2,48	1,04E-04
ENST00000523376	CALCB	Calcitonin-related polypeptide beta	2,88	2,16	2,73	1,68E-04

NM_024081	PRRG4	Proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	2,88	2,16	2,73	2,40E-09
NM_033180	OR51B2	Olfactory receptor, family 51, subfamily B, member 2	3,04	3,10	2,82	3,77E-05
ENST00000454832	SIK3-IT1	SIK3 intronic transcript 1 (non-protein coding)	2,30	3,03	2,32	4,28E-05
NM_002935	RNASE3	Ribonuclease, rnase A family, 3	3,19	2,59	2,15	1,22E-04
NM_182515	ZNF714	Zinc finger protein 714	3,02	2,55	2,70	1,31E-03
NM_006959	ZNF17	Zinc finger protein 17	2,80	2,80	2,55	5,08E-02
NM_001017920	DAPL1	Death associated protein-like 1	2,58	2,24	2,38	6,61E-05
NM_001163561	C2orf61	Chromosome 2 open reading frame 61	2,36	2,38	2,57	5,67E-06
ENST00000371328	FAM209A//FAM209B	Family with sequence similarity 209, member B	2,26	3,19	2,88	6,14E-04
ENST00000390302	IGLV2-33	Immunoglobulin lambda variable 2-33 (non-functional)	2,91	2,50	2,72	0,00191333
XM_005261590	GSTT2	Glutathione S-transferase theta 2	2,47	2,21	2,68	0,00207512
NM_001040448	DEFB131	Defensin, beta 131	2,46	3,02	2,31	7,94E-04
NM_054023	SCGB3A2	Secretoglobin, family 3A, member 2	2,59	2,11	3,02	5,04E-08
NM_001143957	GPR63	G protein-coupled receptor 63	2,55	2,77	2,74	5,45E-07
NM_001024678	LRRC24	Leucine rich repeat containing 24	3,20	2,13	3,05	2,74E-03
NM_005949	MT1F	Metallothionein 1F	2,48	2,03	2,99	2,74E-04
NM_022661	SPANXC	SPANX family, member C	2,89	2,53	2,97	4,96E-06
NR_024560	MAPT-IT1	MAPT intronic transcript 1 (non-protein coding)	2,32	2,35	2,29	7,49E-08

AK092813	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,67	2,32	2,81	3,08E-06
NM_001005285	OR2AT4	Olfactory receptor, family 2, subfamily AT, member 4	2,91	2,54	2,63	8,43E-05
ENST00000390442	TRAV12-3	T cell receptor alpha variable 12-3	2,22	3,02	2,37	1,52E-10
ENST00000390598	IGHV3-7	Immunoglobulin heavy variable 3-7	2,45	3,07	2,77	2,96E-10
ENST00000390304	IGLV3-27	Immunoglobulin lambda variable 3-27	2,96	2,80	2,80	4,51E-06
NM_001270483	TST	Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	2,30	2,24	3,04	5,67E-06
ENST00000507053	DDX46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	2,66	2,80	3,14	9,12E-10
AK294939	DDX39B	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B//small nucleolar RNA, C/D box 84	2,48	2,65	2,36	6,06E-09
NM_001013736	FAM47C	Family with sequence similarity 47, member C	2,61	2,71	2,32	4,35E-08
NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	10,09	6,80	5,40	5,19E-06
NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2	2,54	2,55	2,57	0,00104216
NM_001258038	SPRY1	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	4,43	3,67	4,38	0,01456281
NM_004464	FGF5	Fibroblast growth factor 5	5,26	3,74	5,25	0,01154194
NM_002016	FLG	Filaggrin	- 14,52	-6,99	-2,70	0,00105033
NM_001109754	PTPRB	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-5,06	-3,62	-3,10	3,77E-15

NM_178134	CYP4Z1	Cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1	-3,91	-3,08	3,90	2,74E-12
ENST00000371438	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	-2,09	-2,63	-3,26	0,0110733
NM_001267585	FBXW10	F-box and WD repeat domain containing 10	-2,09	-2,06	-2,33	0,01154194
NM_001202	BMP4	Bone morphogenetic protein 4	- 12,63	-3,36	-2,10	5,69E-11
NM_152429	FGFBP3	Fibroblast growth factor binding protein 3	-3,20	-2,72	-2,07	2,74E-12
NM_001009611	PRAMEF4	PRAME family member 4	-2,01	-3,67	-3,59	0,00115843
NM_002900	RBP3	Retinol binding protein 3, interstitial	-2,47	-2,93	-2,22	0,00115843
NM_001271983	C11orf44	Chromosome 11 open reading frame 44	-2,51	-3,00	-2,89	1,34E-04
NM_001005288	OR5111	Olfactory receptor, family 51, subfamily I, member 1	-3,26	-2,01	-2,28	1,36E-04
NM_001206631	TRIM64C	Tripartite motif containing 64C	-3,48	-2,09	-3,40	1,41E-04
NM_001193471	FOLH1	Folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	-2,35	-2,12	-2,14	1,41E-04
NM_025208	PDGFD	Platelet derived growth factor D	-3,65	-2,39	-3,15	1,47E-04
NM_001135	ACAN	Aggrecan	-2,29	-2,18	-2,12	1,49E-04
NM_012360	OR1F1	Olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 1	-2,21	-2,15	-2,41	1,50E-04
NM_001286075	ATP2A1	Atpase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	-2,06	-2,64	-2,54	1,53E-04
NM_001793	CDH3	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	-2,29	-3,64	-2,11	5,08E-12
NM_001267585	FBXW10	F-box and WD repeat domain containing 10	-2,01	-3,18	-2,51	1,61E-04

NM_005623	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-2,21	-2,14	-2,21	0,00115843
NM_002984	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-2,10	-2,14	-2,16	3,34E-09
NM_138286	ZNF681	Zinc finger protein 681	-2,70	-2,76	-2,39	1,05E-08
uc002qeu.1	LILRA5	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	-2,88	-2,96	-2,54	3,49E-09
NM_198694	KRTAP10-5	Keratin associated protein 10-5	-2,03	-2,62	-2,05	3,49E-09
NM_001084393	DDTL	D-dopachrome tautomerase-like	-2,52	-2,42	-2,03	1,52E-08
NM_177478	FTMT	Ferritin mitochondrial	-3,36	-2,32	-2,40	2,45E-08
NM_001190470	MTRNR2L2	MT-RNR2-like 2	-2,96	-2,81	-2,76	8,74E-09
NM_032532	FNDC1	Fibronectin type III domain containing 1	-2,36	-2,32	-2,40	8,95E-08
NM_001170692	CAGE1	Cancer antigen 1	-3,17	-2,26	-2,34	6,31E-08
ENST00000415525	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	-3,03	-2,68	-2,78	4,07E-08
NM_001039361	PRAMEF10	PRAME family member 10	-2,56	-2,42	2,57	4,95E-07
BC021276	IGHD	Immunoglobulin heavy constant delta	-2,25	-2,71	-3,12	8,32E-08
NR_002931	CLEC4GP1	C-type lectin domain family 4, member G pseudogene 1	-2,92	-2,98	-2,38	9,17E-07
NM_145276	ZNF563	Zinc finger protein 563	-2,64	-2,10	-2,68	2,02E-07
NM_014219	KIR2DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	-2,70	-3,09	-2,95	1,63E-07
ENST00000511306	POTEC	POTE ankyrin domain family, member C	-2,56	-2,26	-2,71	3,20E-06
NR_036685	KRT19P2	Keratin 19 pseudogene 2	-2,24	-2,31	-2,32	2,88E-06

NM_000104	CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-2,49	-2,10	-2,55	3,83E-06
ENST00000387419	MT-TD	Mitochondrially encoded trna aspartic acid	-2,32	-2,16	-2,27	3,02E-06
NM_001001963	OR2L8	Olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 8	-3,06	-2,33	-2,26	2,55E-05
XR_246241	CYP4A1	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 1	-2,12	-2,13	-2,84	1,16E-05
NM_052941	GBP4	Guanylate binding protein 4	-2,22	-2,35	-2,25	4,52E-05
ENST00000369175	FAM72C	Family with sequence similarity 72, member C	-3,05	-2,88	-2,15	8,06E-06
NM_001201536	TAF1A	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kda	-3,01	-2,32	-3,02	3,04E-05
ENST00000316529	OR56B4	Olfactory receptor, family 56, subfamily B, member 4	-2,86	-3,04	-2,75	6,58E-05
NM_207645	C11orf87	Chromosome 11 open reading frame 87	-2,72	-2,20	-2,23	3,46E-05
NM_006982	ALX1	ALX homeobox 1	-2,81	-2,11	-2,82	8,58E-05
NM_004093	EFNB2	Ephrin-B2	-2,36	-2,18	-2,30	1,15E-04
NM_006456	ST6GALNAC2	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2	-2,34	-2,22	-2,55	6,46E-06
NM_005951	MT1H	Metallothionein 1H	-2,26	-2,08	-2,09	7,96E-05
NM_001220488	CDH13	Cadherin 13	-2,50	-2,61	-2,14	1,83E-04
NM_031957	KRTAP1-5	Keratin associated protein 1-5	-2,40	-2,57	-2,09	1,19E-04
NM_030967	KRTAP1-1	Keratin associated protein 1-1	-3,03	-3,03	-2,44	4,39E-05
NM_001165252	KRTAP2-3	Keratin associated protein 2-3	-2,32	-2,25	-2,56	2,62E-04

NM_001242907	TCEB3CL2	Transcription elongation factor B polypeptide 3C-like 2	-2,42	-2,24	-2,46	3,15E-04
AK303593	BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2	-2,47	-2,22	-2,15	9,52E-05
NM_003430	ZNF91	Zinc finger protein 91	-2,41	-2,85	-2,60	3,58E-04
NM_001163561	C2orf61	Chromosome 2 open reading frame 73	-2,14	-2,86	-2,10	3,72E-04
ENST00000392701	GALNT3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	-2,88	-2,73	-2,22	2,05E-04
ENST00000446716	ATG9A	Autophagy related 9A	-2,21	-2,22	-2,23	6,25E-04
NM_198687	KRTAP10-4	Keratin associated protein 10-4	-2,52	-2,44	-2,89	7,41E-04
NM_003392	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	-2,18	-2,38	-2,28	2,75E-04
NM_032961	PCDH10	Protocadherin 10	-2,52	-2,97	-3,03	1,69E-08
NM_001253727	RXFP1	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	-2,47	-2,27	-3,11	0,00195225
NM_000908	NPR3	Natriuretic peptide receptor 3	-3,12	-2,96	-2,16	0,00200613
ENST00000507053	DDX46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	-3,06	-2,36	-3,06	0,00104385
ENST00000394409	PPP2R2B	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	-2,42	-2,14	-2,11	0,00227964
ENST00000314332	HIST1H2BG//HIST1H2BF //HIST1H2BE//HIST1H2BI// HIST1H2BC	Histone cluster 1, h2bg	-2,14	-2,55	-2,54	0,00229002
NM_001293626	LOC93432	Maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	-2,26	-2,40	-2,62	7,75E-04
NM_004840	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide	-3,00	-2,76	-3,01	0,0030292

		exchange factor (GEF) 6				
NM_015869	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-2,34	-2,45	-2,29	0,00149306
NM_000037	ANK1	Ankyrin 1, erythrocytic	-2,25	-2,70	-2,80	0,00326132
NM_001190476	MTRNR2L4	MT-RNR2-like 4	-2,09	-2,39	-2,20	0,00372433
NM_144690	ZNF582	Zinc finger protein 582	-3,49	-3,89	-3,34	0,00392593
NM_018476	BEX1	Brain expressed, X-linked 1	-2,85	-2,39	-3,02	7,76E-04
BC064619	CD24	CD24 molecule	-2,66	-2,26	-2,74	1,29E-04
NM_015849	CELA2B	Chymotrypsin-like elastase family, member 2B	-2,54	-2,38	-2,29	1,08E-04
NM_001282588	SLAMF7	SLAM family member 7	-2,22	-2,19	-2,82	2,13E-04
NM_021186	ZP4	Zona pellucida glycoprotein 4	-2,45	-2,25	-2,33	1,13E-04
NM_001005186	OR6Q1	Olfactory receptor, family 6, subfamily Q, member 1	-2,10	-2,20	-2,29	3,97E-05
ENST00000451616	PGA5	Pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)	-3,12	-2,86	-2,43	1,20E-04
NM_001005324	OR10V1	Olfactory receptor, family 10, subfamily V, member 1	-2,28	-2,55	-2,41	1,23E-04
ENST00000390438	TRAV8-4	T cell receptor alpha variable 8-4	-2,31	-2,43	-2,73	1,44E-04
NM_001204416	RGS6	Regulator of G-protein signaling 6	-2,59	-3,07	-2,98	6,93E-04
ENST00000556551	PTGR2	Prostaglandin reductase 2	-2,31	-4,04	-2,03	5,17E-05
AK097435	TP53TG3//TP53TG3C//TP53TG3B	TP53 target 3//TP53 target 3C//TP53 target 3B	-3,01	-2,19	-2,80	3,05E-04
NM_020995	HPR	Haptoglobin-related protein	-3,08	-2,60	-3,02	1,54E-04
ENST00000564671	TERF2IP	Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	-3,24	-2,64	-3,10	1,54E-04

NM_001100112	MYH2	Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	-2,62	-2,86	-2,34	4,54E-04
ENST00000329882	CSH1//CSHL1//GH1	Chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen)//chorionic somatomammotropin hormone-like 1//growth hormone 1	-2,24	-2,63	-2,13	2,33E-04
ENST00000382349	ONECUT3	One cut homeobox 3	-3,01	-2,63	-3,28	1,57E-04
NM_000554	CRX	Cone-rod homeobox	-2,58	-2,85	-2,15	1,94E-04
NR_002931	CLEC4GP1	C-type lectin domain family 4, member G	-3,15	-2,19	-2,83	3,83E-04
NM_000762	CYP2A6	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	-2,20	-2,67	-2,34	2,04E-04
AL833447	ZNF285	Zinc finger protein 285	-2,20	-3,21	-2,97	2,00E-04
NM_014219	KIR2DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	-2,18	-2,22	-2,43	1,95E-04
NM_024795	TM4SF20	Transmembrane 4 L six family member 20	-2,45	-2,37	-3,07	2,02E-04
ENST00000371328	FAM209A//FAM209B	Family with sequence similarity 209, member A//family with sequence similarity 209, member B	-2,95	-2,71	-3,19	8,60E-05
ENST00000390306	IGLV2-23	Immunoglobulin lambda variable 2-23	-2,04	-2,81	-2,66	2,20E-04
NM_001136213	POTEH	POTE ankyrin domain family, member H	-3,01	-2,82	-2,38	2,14E-04
NM_001199978	PLSCR2	Phospholipid scramblase 2	-2,67	-2,69	-3,16	2,07E-04
NM_139248	LIPH	Lipase, member H	-2,64	-2,82	-2,25	9,14E-05
NM_005546	ITK	IL2-inducible T-cell kinase	-2,16	-2,45	-2,64	2,21E-04

NM_025218	ULBP1	UL16 binding protein 1	-2,17	-2,33	-2,16	2,44E-04
NM_001080538	AKR1B15	Aldo-keto reductase family 1, member B15	-2,01	-2,35	-2,20	1,80E-04
NM_001190487	MTRNR2L6	MT-RNR2-like 6	-3,05	-2,91	-2,36	2,81E-04
NM_000238	KCNH2	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	-2,38	-2,10	-2,21	2,84E-04
ENST00000378120	BLACE	B-cell acute lymphoblastic leukemia expressed	-2,06	-2,92	-2,09	0,00179338
NM_001001874	TPD52L3	Tumor protein D52-like 3	-2,21	-2,11	-2,44	3,02E-04
NM_001293798	DUX4	Double homeobox 4	-2,72	-2,21	-2,15	3,18E-04
NM_001168647	CNKSR2	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2	-3,00	-2,29	-3,08	3,12E-04
NM_001077188	HS6ST2	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	-2,66	-2,75	-2,57	0,00192307
NM_001009609	SPANXN3	SPANX family, member N3	-3,20	-3,17	-3,13	3,29E-04
NM_004825	CDY2A	Chromodomain protein, Y-linked, 2A	-2,50	-3,01	-2,51	5,65E-04
ENST00000451062	FAM197Y9	Family with sequence similarity 197, Y-linked, member 9	-2,88	-2,72	-2,68	5,63E-04
XR_427902	LOC166994	Integral membrane glycoprotein-like	-2,31	-2,92	-2,48	1,52E-08
NM_004465	FGF10	Fibroblast growth factor 10	-2,20	-3,01	-2,19	8,74E-09
NM_003862	FGF18	Fibroblast growth factor 18	-2,95	-2,43	-2,36	6,74E-07
NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-3,16	-2,83	-3,48	5,67E-06
NM_002607	PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor alpha	-2,06	-2,81	-2,60	9,01E-06
NM_005559	LAMA1	Laminina alpha 1	-2,58	-2,94	-2,93	1,25E-06

ENST00000267843	FGF7	Fibroblast growth factor 7	-2,40	-2,49	-2,20	0,0110733
NM_000095	COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	-2,26	-2,74	-2,25	0,01154194
NM_002609	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta	-3,12	-2,96	-3,07	1,63E-04
XM_005245820	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-2,81	-3,39	-2,65	5,67E-06
NM_001040194	AGTRAP	Angiotensin II receptor-associated protein	-2,06	-2,09	-2,09	1,52E-03
NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	-4,20	-4,85	-4,27	0,00392593

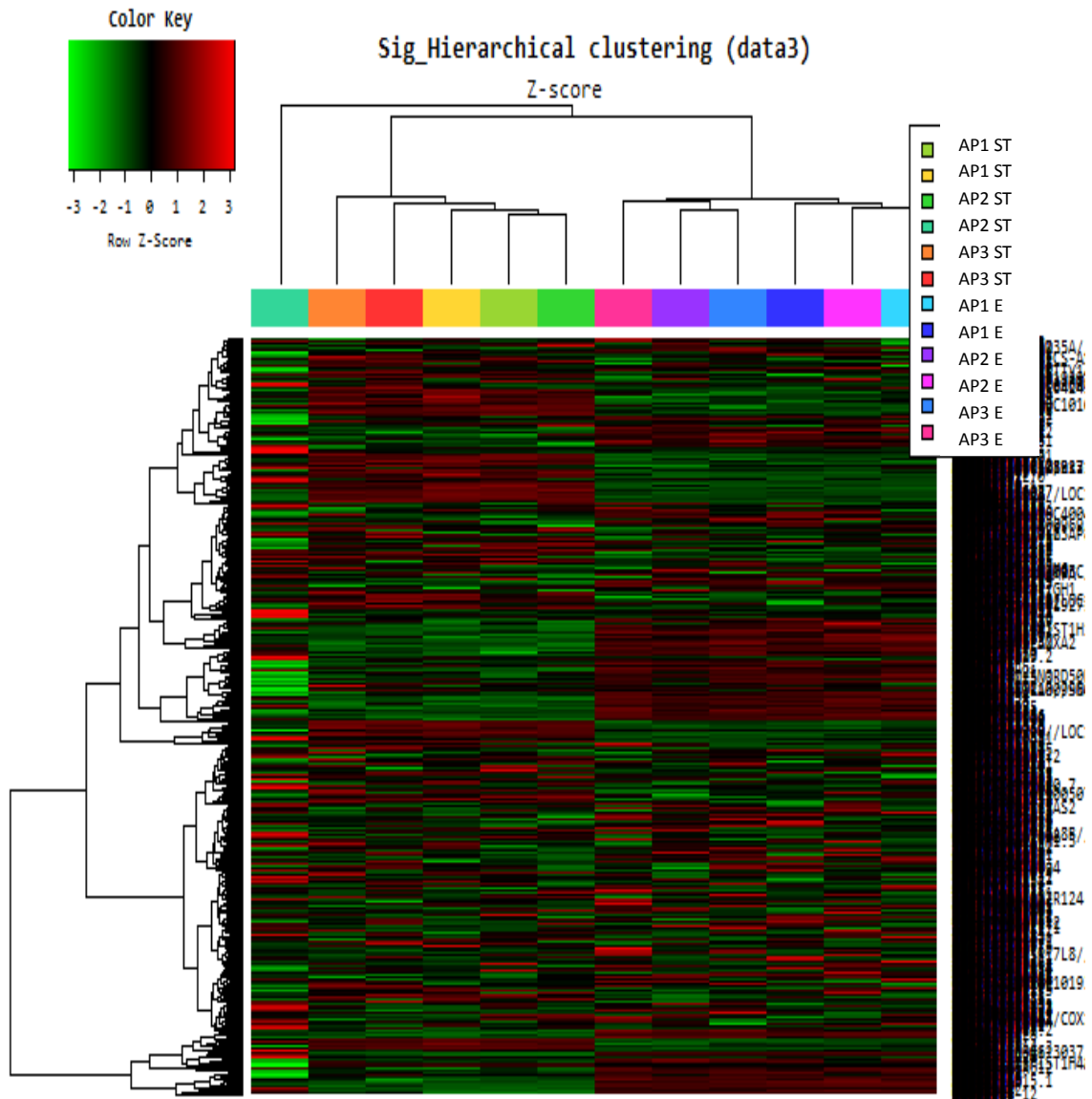
Tabla 9. Categorías funcionales agrupadas

Categoría funcional GO	Genes asociados	<i>p value</i>
Componente celular:	<p><u>MATRIZ EXTRACELULAR</u></p> <p><u>(52 genes):</u></p> <p><i>ASPN, PXDN, COL21A1, MMP9, MMP3, MMP1, OGN, DSPP, HMCN1, CTGF, COL12A1, COL11A1, SPON1, EGFL6, ZP4, COL22A1, ANXA2P3, MMP12, , BGN, VCAM1, ADAMTS3, MFAP4, ADAMTS2, OTOL1, MFAP5, WNT5A, COL28A1, SPOCK1, DCN, VIT, TIMP3, CPZ, LAMB3, AMELX, SMOC1, COMP, RPTN, ACAN, PCHD10, BMP4, HAPLN1,</i></p>	1,97E-44

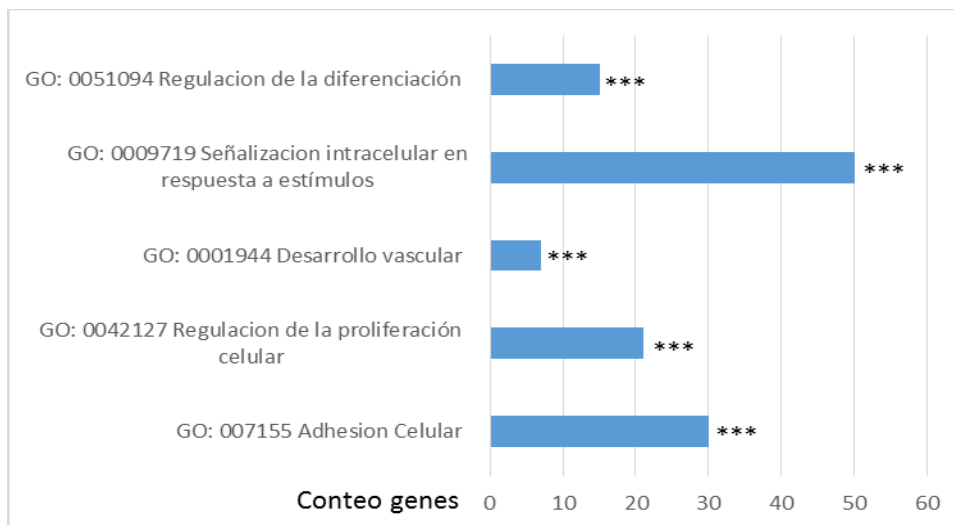
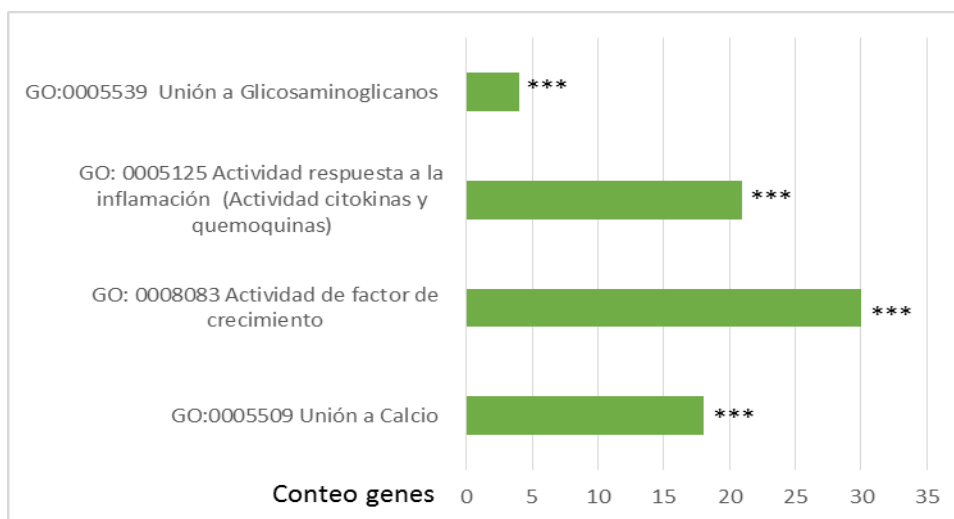
	<i>COL4A1, TNXB, C2ORF61, HSPG2, ECM1, LAMA1, FBLN1, CDH3, CDH13</i>	
Proceso biológico:	<u>REGULACION DE LA PROLIFERACION CELULAR Y APOPTOSIS (21 genes):</u> <i>FGF2, MTRNR2L2, PTPRB, ATG9A, MMP13, F3, RUNX2, SERPINB2, AKR1B15, MAP3K1, COMP, IGF1, CDH13, IGFBP3, TP53TG3, TERF2IP, FGF7, FGF10, DDX46, PPP2R2B, DAPL1</i>	1,18E-10
Función molecular	<u>UNIÓN A GAGs (4 genes):</u> <i>PDGFA, IGFBP3, FGFBP3, PDGFRB.</i>	7,48E-08

Listado de genes agrupados en categorías funcionales según Gene Ontology: Componente celular, Proceso biológico o Función molecular. Cada proceso tiene anotado el *p value* que muestra la significancia estadística del set de genes anotados en conjunto.

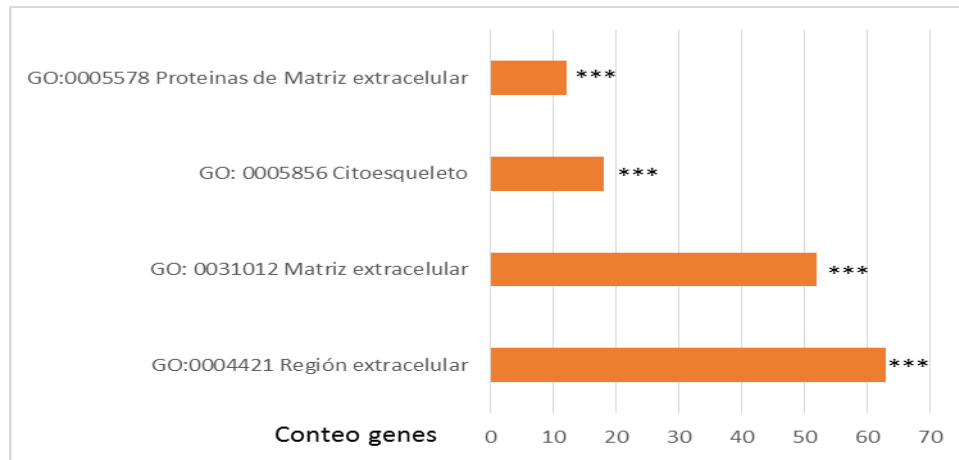
Figura 14. Heatmap que representa el agrupamiento de las muestras y la expresión génica diferencial.



Heatmap que muestra agrupamiento jerárquico de las muestras según distancia euclídea. En verde genes a la baja, en Rojo genes a la alza. AP1-2-3: paciente 1, 2 y 3 respectivamente. ST: muestras sin tratamiento, E: muestras con tratamiento con Elaprase®.

Figura 15. Anotación funcional en *Gene Ontology***A. Procesos biológicos (BP)****B. Funciones moleculares (MF)**

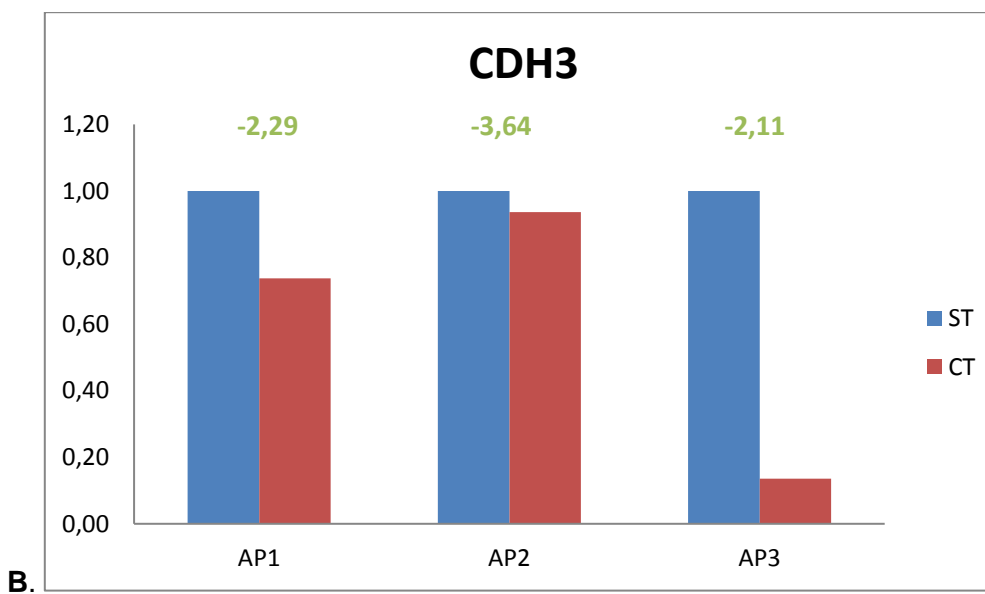
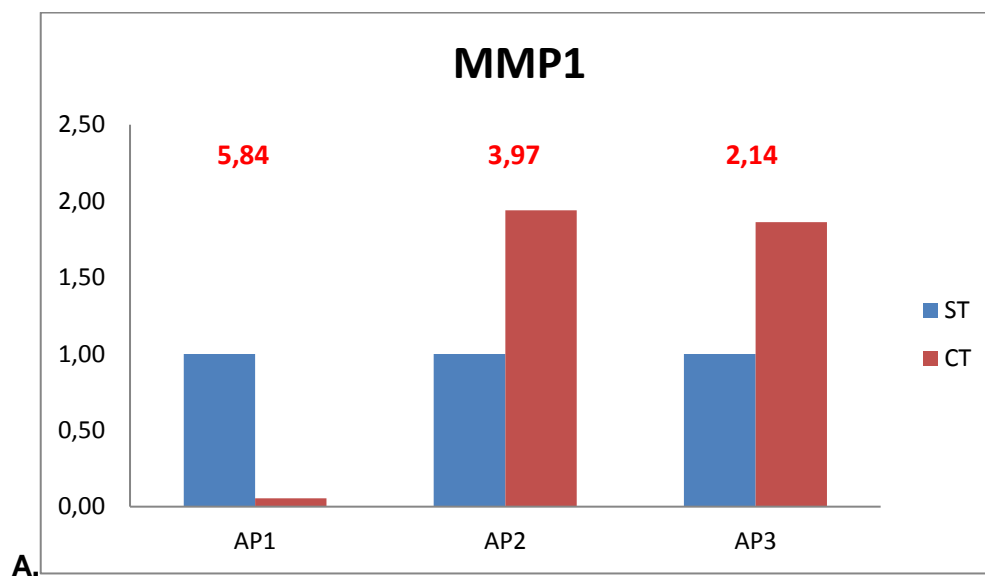
C. Componente celular (CC)

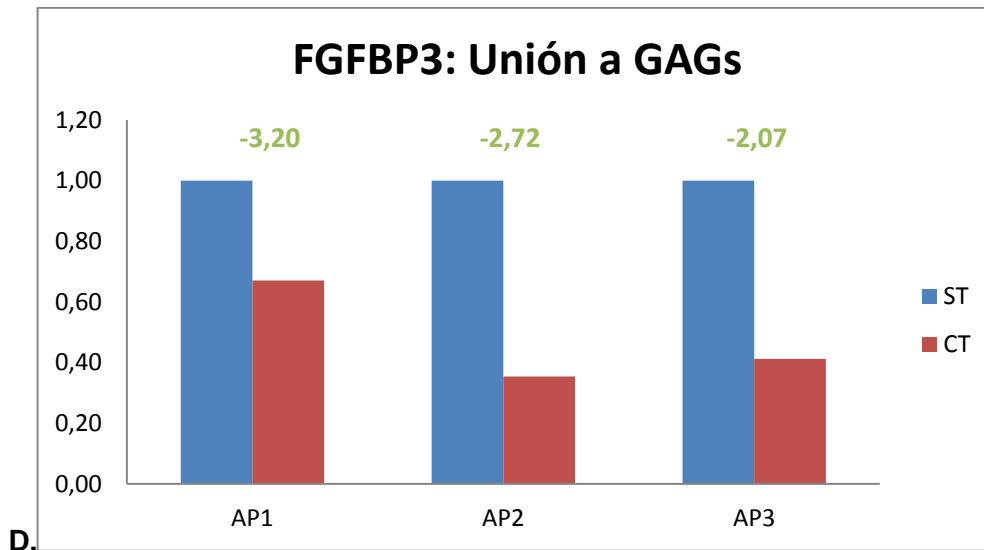
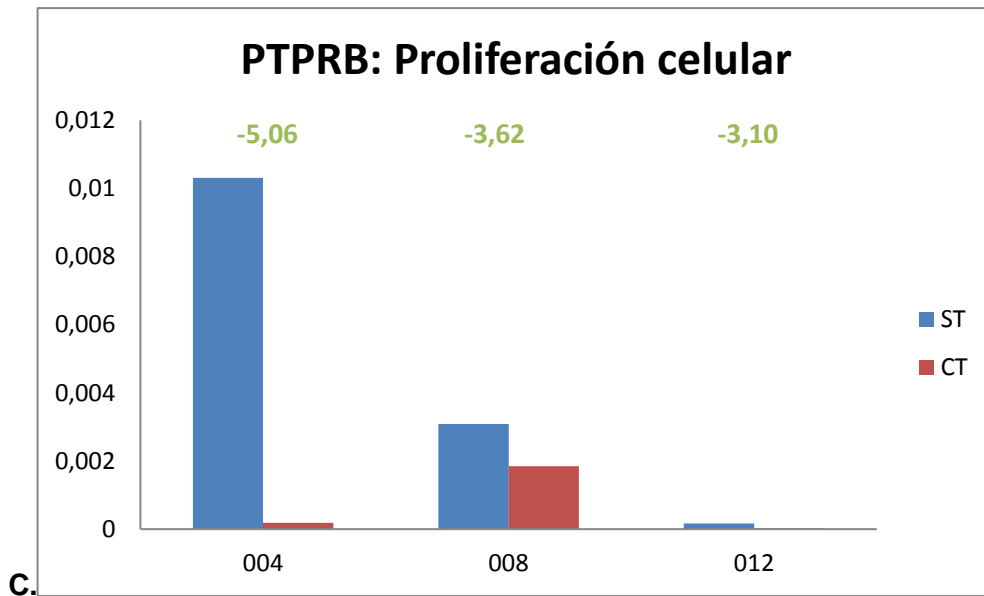


Gráficos de barras horizontales que representa el conteo de genes agrupados en cada proceso en las categorías funcionales de Gene Ontology (GO) después de su anotación funcional: A. Procesos biológicos; B. Funciones moleculares y C. Componente celular. *P value* <0,05 (*), 0,01 (**), <0,001 (***)

5.8 PCR en Tiempo Real Cuantitativa (qRT-PCR) para validación de datos del Microarray:

Se validaron los genes de interés en todos los procesos con mayor enriquecimiento de acuerdo a su representación en las vías y el *fold change* más alto: Matriz Extracelular: MMP1, CDH3 (**Figura 16A- B**), Proliferación celular: PTPRB (**Figura 16C**) Unión a GAGs: FGFBP3 (**Figura 16D**). Los resultados corroboran lo encontrado en el Microarray para los 4 genes escogidos: regulados a la baja FGFBP3, CDH3, PTPRB, así mismo se pudo verificar un comportamiento a la alza para MMP1, correspondiente con lo encontrado en el microarray pero solo en los pacientes 2 y 3 (**Figura 16A**). El estadístico T demostró significancia estadística con un *p valor* de 0.0425.

Figura 16. Genes validados mediante qRT-PCR

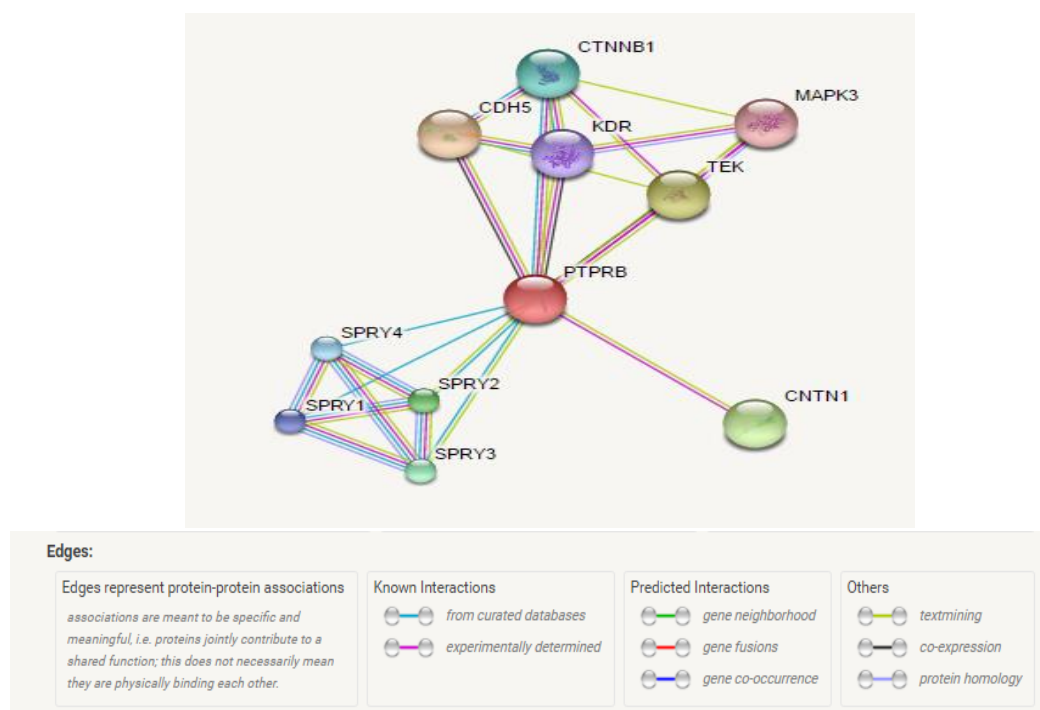


Resultados de qRT-PCR: Niveles de expresión de genes según qRT-PCR vs los resultados del Array para cada paciente al comparar las condiciones de tratamiento con Idursulfase® versus sin tratamiento. A. Genes relacionados con MEC: MMP1, CDH3. B. Proliferación celular: PTPRB y C. Unión a GAGs: FGFBP3. Se enuncia en la parte superior los valores del Fold change resultado del Array para cada paciente al comparar la condición basal y posterior al tratamiento con Elprase®: (AP1: paciente con SA 1; AP2: paciente con SA 2, AP3: paciente con SA 3; ST: Sin tratamiento, CT: con tratamiento con Elaprased®).

5.9 Aproximación bioinformática a plataformas de interacción proteica:

Los resultados de la base de datos STRING, al incluir la proteína PTPRB analizada por su importancia en el proceso biológico de interés (proliferación celular) y por su validación mediante qRT-PCR mostró interacciones principalmente con proteínas de adhesión celular como cadherinas(CDH5), proteínas implícitas en la vía *FGFR2* como MAPK3 y proteínas que hacen parte de la vía *WNT* como CTNNB1 y de la vía *SPRY*, ambas con rol dual en procesos proliferativos y de diferenciación osteoblástica (**Figura 17**). Es de gran importancia considerar que PTPRB se comporta como un activador de mitosis en las señales intracelulares desencadenadas posterior a la activación del receptor FGFR2, ampliamente reconocido como receptor de tipo Tirosin Kinasa.

Figura 17. Resultados en STRING interacciones de PTPRB

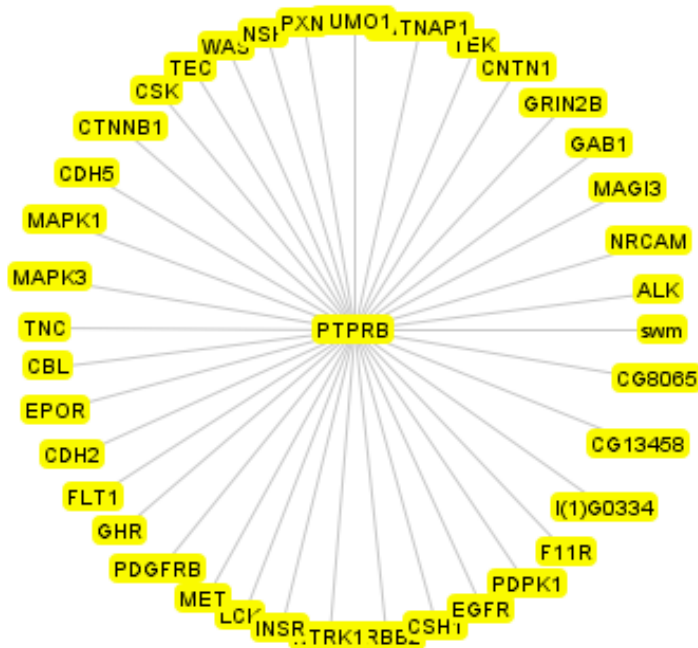


Visualización de red de interacciones a partir de PTPRB como nodo principal, las líneas representan de acuerdo al color interacciones conocidas o predichas.

Los resultados de esta base de datos permiten también conocer la anotación funcional, relacionando la red con regulación de la vía MAP kinasas, la vía ERK1 y 2 y la vía de señalización RAS, todas participantes de procesos de mitogénesis contribuyentes en la fisiopatología del síndrome de Apert.

Por su parte, la base de datos PINA2 relaciona a la proteína PTPRB con 39 interacciones conocidas alojadas en distintas bases de datos: entre los que destacan otros recetores tipo tirosin Kinasa (ALK, EGFR, PDGFRB), cadherinas y otras moléculas de adhesión (CDH2, CDH5, CNTN1), proteínas MAP kinasas (MAPK1, MAPK3) y proteínas de Matriz extracelular (PXL, TNC) (**Figura 18**).

Figura 18. Red de interacciones proteicas de PTPRB en PINA



Visualización de red de interacciones a partir de PTPRB como nodo principal en PINA, las interacciones se muestran por defecto como interacciones binarias (Directas) conocidas y alojadas en distintos repositorios.

6. Discusión

6.1 Establecimiento un modelo *in vitro* con fibroblastos perióísticos en pacientes con síndrome de Apert:

Los mecanismos moleculares subyacentes al comportamiento anormal de las células de las suturas craneales en los procesos de craniosinostosis continúan inciertos. En este estudio, con el fin de aportar a la comprensión de estos mecanismos se procedió a la estandarización un modelo *in vitro* con cultivos celulares de fibroblastos perióísticos a partir de explantes óseos de pacientes con Síndrome de Apert. En primera instancia, y con el fin de asegurar la homogeneidad de la población celular se analizó la morfología celular tipo fibroblastoide, la cual podía confundirse con la de las células mesenquimales que también están presentes en esta región anatómica, sin embargo estas últimas no crecen en el medio utilizado en este estudio (DMEM alto en glucosa 4500mg/mL) y forman aglutinamiento celular en forma de colonias, lo cual no se visualizó en los cultivos de este estudio (75). Una característica particular exhibida por las fibroblastos cultivados, fue su lento crecimiento inicial y su rápido proceso de senescencia propios de este tipo de cultivos(76). Finalmente se utilizó la técnica de epi-inmunofluorescencia para determinar, por medio del anticuerpo *Anti-Fibroblast activation protein alpha*, específico de fibroblastos, el origen fibroblastoide de las células y proceder con el desarrollo del experimento.

Para identificar a partir de los cultivos celulares de fibroblastos las moléculas protagonistas en el proceso patológico del Síndrome de Apert, y de particular interés los efectores de la vía del receptortipo tirosin Kinasa FGFR2 relacionadas con procesos de proliferación celular, se planteó la necesidad de establecer un perfil de expresión génica diferencial basado en tecnología de Microarray en un modelo celular que expresará la isoforma mesenquimal del receptor *FGFR2 (FGFR2IIIc)* propio del tejido y de la patología que fueron objeto de estudio. Para este fin se aplicó un tratamiento con Elapraxe®, con el fin de modificar la configuración tridimensional necesaria para la activación del receptor, el cual tiene como uno de los tres

componentes indispensables para su activación la molécula de Heparan Sulfato (46) blanco del tratamiento utilizado.

6. 2 Relevancia del proceso de proliferación celular en la fisiopatología del Síndrome de Apert:

A pesar del gran progreso en la detección y análisis de los genes causantes de craniosinostosis en los años recientes, patologías como el Síndrome de Apert continúan siendo desordenes heterogéneos y complejos (77). Aunque es reconocido que el SA es un desorden monogénico y el 99% de los pacientes cuentan con diagnóstico molecular, los mecanismos patológicos resultantes de la perturbación de las vías intracelulares a partir del receptor *FGFR2* mutado continúan inconclusos y contradictorios en la literatura.

El proceso de craniosinostosis involucra diferentes momentos del desarrollo, y diferentes procesos moleculares que se orquestan simultáneamente, de los cuales los procesos proliferativos y de diferenciación son los protagonistas. Las vías activadas que incluyen moléculas como ERK 1/2 se han relacionado con la proliferación celular en las células precursoras de osteoblastos y controla a su vez en menor medida la diferenciación celular mediada por *FGFR2*(61).

La vía del fosfatidil inositol 3 fosfato quinasa (PI3K) y de las MAP Kinasas también participan en el control de la osteoblastogénesis mediada por FGF, promoviendo la proliferación celular de células progenitoras y controlando los procesos de mitosis (51, 54). En general las células mesenquimales progenitoras requieren para su diferenciación a osteoblastos maduros a nivel de las suturas craneales de una etapa inicial donde ocurre inicialmente una proliferación y luego por acción de diferentes

moléculas, culmina su proceso de maduración. En un estado de perturbación del receptor *FGFR2* como en el SA, se altera el balance entre los procesos proliferativos y apoptóticos, llevando no solo a un menor número de células osteoprogenitoras disponibles a nivel de las suturas, sino también al establecimiento prematuro de las señales necesarias que favorecen el proceso de osificación a nivel de las suturas (77).

Los resultados iniciales, basados en los transcritos analizados por el Genechip® se ajustan con los procesos relacionados en la fisiopatología del síndrome de Apert. Estudios previos en fibroblastos de calvaria de pacientes con craniosinostosis no sindrómicas y con SA han mostrado patrones de expresión diferencial. Carinci et al. (74) encontraron que las vías con mayor enriquecimiento correspondían a diferenciación ósea, regulación del ciclo celular, apoptosis y transducción de señal y Stamper et al (78) en tejido de sutura única reportaron patrones de diferenciación génica asociados a matriz extracelular, procesos que también se fueron protagonistas en este proyecto. Particularmente, Fanganiello et al. (79) en tejido de pacientes con SA describió genes al alta asociados a PROLIFERACIÓN CELULAR y genes a la baja relacionados con expresión génica, adhesión celular y organización de la matriz extracelular. El proceso proliferativo se convierte en uno de los protagonistas de los estudios de expresión diferencial, por lo cual se indago con puntualidad en este estudio.

El comportamiento de los fibroblastos cultivados en este estudio derivados de pacientes con Síndrome de Apert fue dado por una proliferación inicial lenta, requiriéndose para su adherencia y confluencia de aproximadamente 3 a 4 semanas a partir del explante, seguido de una fase proliferativa rápida (Entre el 2 al 5 pasaje) y de una fase final de senescencia temprana (Antes del 10 pasaje). En los cultivos derivados de pacientes sanos, los fibroblastos tuvieron un crecimiento celular más lento a partir de los explantes de hasta 6 semanas para confluencia inicial, pero estos provenían de suturas completamente osificadas. Con la aplicación del tratamiento se observó un efecto proliferativo indirecto en todas las células cultivadas, que parece

no relacionarse con la carga mutacional, pero que en el caso de los pacientes podría correlacionarse con un estado proliferativo postnatal detenido por efectos de la mutación a nivel de la sutura coronal, como se observa en los procesos de resinostosis, y que podría estar revirtiendo con el bloqueo de la señalización del receptor FGFR2.

6.3 Perfil de expresión génica diferencial relacionado con proliferación celular:

Fue posible evidenciar con el cubrimiento sobre transcriptoma completo del Microarray, cambios posteriores al tratamiento en genes relacionados con componentes Matriz extracelular, proliferación celular, diferenciación celular entre otros, que se ajustan a lo previamente descrito en los procesos moleculares fisiopatológicos (34, 79). Los genes relacionados con proliferación que mostraron cambios fueron *FGF2*, *MTRNR2L2*, *PTPRB*, *ATG9A*, *MMP1*, *F3*, *RUNX2*, *SERPINB2*, *AKR1B15*, *MAP3K1*, *COMP*, *IGF1*, *CDH13*, *IGFBP3*, *TP53TG3*, *TERF2IP*, *FGF7*, *FGF10*, *DDX46*, *PPP2R2B*, *DAPL1*. Adicionalmente, con base en los resultados, se desarrolló una qRT-PCR para confirmar la regulación a la alza y a la baja de 4 genes de interés (*MMP1*, *PTPRB*, *CDH3* y *IGFBP3*) que se relacionaron con el proceso proliferativo dado el interés del estudio. En todos los genes fue posible confirmar la expresión en la misma dirección excepto en un paciente para el caso de *MMP1*, sin embargo, se ha reportado que en más del 50% de los casos no se puede confirmar los genes encontrados por microarray por tecnología qRT-PCR (80, 81).

Inicialmente para el caso del gen *PTPRB* (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta), las células acá tratadas con Elaprase® mostraron una expresión a la baja en este gen, asociado a la regulación de la proliferación. En las interacciones proteicas evidenciadas en las bases de datos, se comprobó la participación de este receptor en la activación de la vía de los efectores MAP-Kinasas y ERK, relacionados con la vía *FGFR* y con los procesos que activa,

particularmente la regulación de la proliferación y la diferenciación osteoblástica (51) y también de moléculas de la vía *Wnt-B catenina*, la cual es ampliamente reconocida como participante en procesos proliferativos y de morfogénesis (62). En estudios recientes han relacionado mutaciones inactivadoras en *PTPRB* en procesos proliferativos de transformación oncogénica, como lo observado en angiosarcomas, los cuales se relacionan con la activación de la vía MAPK que conlleva altas tasas de mitosis y crecimiento celular(82). Este gen también guarda estrecha relación, según lo observado en las redes de interacción proteicas, con moléculas de adhesión celular y además de involucrar en su estructura proteica un dominio de tipo fibronectina, se relaciona ampliamente con moléculas como Tenascinas y Cadherinas que también se modularon en las células de pacientes con SA posterior al tratamiento con Elaprased®.

Componentes de la Matriz extracelular han sido asociados recientemente con los procesos fisiopatológicos en SA. Por un lado, las moléculas de HS son necesarias para la activación del receptor FGFR2, y se han encontrado niveles elevados de esta molécula en tejido de calvaria de pacientes con SA, pero también moléculas como ácido hialurónico, Colagenos, Fibronectina y Agrecanes se han visto sobreexpresados en esta patología (73). En este caso, se encontró un aumento en la expresión de genes asociados con la arquitectura de la MEC como Metaloproteinasas y Tenascinas (*MMP1*, *MMP3* y *TNXB*) concomitante con una disminución en la expresión de los genes de adhesión focal como protocadherinas y Cadherinas (*PCDH10*, *CDH13* y *CDH3*), contrastando con lo reportado previamente por Ornitz DM et al y Belov AA et al, quienes postulan que el receptor mutado en el modelo de Apert promueve la disminución de genes que modulan la arquitectura de la MEC y aumentan las proteínas de adhesión focal (34, 41). Las moléculas de tipo Cadherina, son importantes además por su asociación con la vía ERK, la vía más importante en la fisiopatología de craniosinostosis en el SA y que se relaciona con la regulación de procesos proliferativos (54).

Aunque se verificó mediante qRT-PCR la modulación a la baja de Cadherina 3 (*CDH3*), cabe mencionar que en conjunto con otras cadherinas como *CDH13*, también modulada a la baja en el presente estudio, son normalmente sobreexpresadas en los tejidos en desarrollo, particularmente a nivel de Sistema Nervioso central (83). Se ha observado que tumores que sobreexpresan Cadherinas pierden la capacidad mitogénica en respuesta al Factor de crecimiento epidérmico – *Epidermal Growth Factor (EGF)*. Tanto *EGF* como los *FGF* son factores necesarios para la proliferación de células progenitoras de tipo neural y mesenquimal y se sugiere que dada la relación de las moléculas de cadherinas con estos factores de crecimiento, se comportarían como un regulador negativo del crecimiento celular (83).

Otro gen de interés que fue regulado a la alza posterior al tratamiento es *SerpinB2* (*Serpin peptidase inhibitor, clase B (ovalbumin), member 2*), este se relaciona con crecimiento celular, progresión del ciclo celular y apoptosis. Se ha reportado que niveles altos de *SerpinB2* promueven autofagia y senescencia, por lo cual se ha relacionado con pronóstico favorable en cáncer de seno y páncreas (84) y aunque se conoce la función de tipo proteasa a nivel extracelular los efectos biológicos a nivel de las suturas craneales no es claro, pero se cree que este mecanismo podría ser necesario para el mantenimiento del balance entre procesos proliferativos y apoptóticos que podrían también comportarse igual que al controlar el crecimiento tumoral y de metástasis (84).

La importancia de moléculas como *IGF1* y *2* en el proceso osteogénico es amplia. Su actividad se relaciona con otras moléculas como *BMP* y *PI3K* favoreciendo el proceso de diferenciación (85), estas moléculas también fueron moduladas con el tratamiento aplicado en el presente estudio evidenciándose *IGF1* al alza. Por su parte *IGFBP3* (Insulin-like growth factor-binding protein 3) fue modulado al alza, este gen se relaciona con procesos de diferenciación y proliferación, se reconoce la relación con otros receptores como el *proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ)*, *Retinoic Acid Receptor (RAR)* y *vitamin D receptor (VDR)*, ejerciendo sus efectos a partir de estas relaciones. Por ejemplo, la capacidad de modular los procesos en

osteoblastos se establece a partir de la interacción con *VDR* y la prevención de la dimerización de RAR en células con potencial oncogénico, evidencian su participación en procesos proliferativos (85). Niveles elevados de este gen, como los evidenciados en este estudio, podrían convertirse en antagonistas de las moléculas IGF1 y 2 y ayudar a mitigar el impacto sobre los procesos que favorecen el potencial osteogénico en desarrollo por acción de estas moléculas (85).

Las mutaciones en *FGFR2* que desencadenan SA, se manifiestan, entre otras cosas, con una ganancia de afinidad por ligandos como FGF10, FGF7, FGF18 y FGF19. Se encontró una expresión diferencial a la baja después del tratamiento en tres de estos genes (FGF10, FGF7 y FGF18), lo cual podría ralentizar el proceso de osificación temprana presentado en estos pacientes. FGF7 y FGF10 son normalmente sobrexpresados en tejido mesenquimal pero se unen solo a la forma epitelial del receptor (*FGFR2IIIb*)(86), las mutaciones en la isoforma mesenquimal permiten la activación por estos ligandos y favorecen la señalización autocrina en el tejido mesenquimal la cual normalmente es restringida. Este efecto autocrino se ha asociado con la severidad y particularidad del Síndrome de Apert en comparación con otras craniosinostosis sindrómicas (86). En este caso ante la disminución de los ligandos, el efecto sobre el tejido podría lograr el restablecimiento del proceso fisiológico normal.

Se ha demostrado que en la patología del síndrome de Apert, también existen defectos en la osificación endocondral, por esto existen defectos a nivel de las extremidades como sindactilias. En este proceso también participan ligandos como el FGF7, ya que existe también una sobreexpresión de este factor junto con la sobreexpresión del receptor en las células condensadas en el precartilago (29). Este proceso también se ve representado por el cambio de afinidad presente en el receptor *FGFR2* descrito previamente.

Hallazgos reportados previamente muestran un incremento en la expresión de FGF10 y FGF19 en fibroblastos de calota de pacientes afectados (34, 87). La señalización FGF juega un importante rol durante el desarrollo cranial ya que tanto la expresión de

FGFR2 es crucial en células osteoprogenitoras proliferantes durante el desarrollo de las suturas craneales, como su activación por los ligandos, la cual se encuentra incrementada en el SA y resulta en la fusión de las suturas como consecuencia de la alteración del balance entre el proceso proliferativo y de diferenciación (86). Otro de los factores que interviene en la patogénesis mediada por el FGFR2 mutado también es el incremento en la expresión de EFGR y PDGFRa, sobreactivando la vía ERK en SA (88). En contraposición a ese perfil genómico, las células tratadas con Elaprase® subexpresaron PDGFRa en el modelo *in vitro* lo que podría reducir la disregulación de genes osteoblásticos y detener el proceso de osificación.

Otro gen de interés en el proceso proliferativo encontrado a la alza postratamiento es *Dapl1* (*Death Associated Protein Like 1*), este gen actúa como un mediador positivo de la muerte programada a través de la inducción por interferon-gamma, cuando este gen se encuentra regulado a la baja favorece la presencia de patología al perturbar los procesos de muerte celular, aunque no es claro su papel en craneosinostosis, si se ha relacionado claramente con degeneración macular a nivel de la retina (89).

6.4 Heparan Sulfato como posible blanco terapéutico en Síndrome de Apert:

Los resultados aquí presentados, muestran que las interacciones del complejo FGF-HS-FGFR representan un excelente blanco terapéutico en el SA, así como también en procesos oncogénicos y otras enfermedades relacionadas con la señalización FGF. Las interacciones entre el receptor y la molécula son altamente específicas y reguladas, por lo cual los agentes contra HS como el usado en este modelo *in vitro*, pueden dirigirse sin muchos efectos adversos dada la localización extracelular y minimizar así el riesgo de resistencia (90). Se ha intentado modificar químicamente la estructura de la molécula de GAGs logrando resultados positivos, sin embargo no están claros los niveles de desulfatación necesarios para una modificación química

exitosa (90), y el tratamiento para degradación enzimática que existe actualmente para el tratamiento de patologías que involucran la acumulación de esta molécula, facilitaron para este estudio el proceso de modificación del complejo para la activación del receptor al degradar HS específicamente, la cual es un área pobremente estudiada.

7. Conclusiones

La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el comportamiento anormal del periostio tiene importantes implicaciones en el pronóstico de la reparación quirúrgica de la craneosinostosis sindrómica, el cual es el único tratamiento disponible y no garantiza un manejo definitivo por la presencia de resinostosis.

El espectro completo de factores moleculares que modulan estos comportamientos celulares aberrantes quedan aún por determinar, sin embargo, el establecimiento del perfil de expresión génica después de la degradación de HS en células Apert contribuye a la identificación de nuevos genes con funciones importantes en la osificación de las suturas craneales y potenciales biomarcadores en las craneosinostosis sindrómicas.

Estos resultados describieron redes génicas y procesos celulares implicados en la modificación o recuperación parcial de los algunos procesos patológicos del SA. Es necesario realizar ensayos en un modelo animal para en un futuro proponer un tratamiento alternativo novedoso para SA basado en la regulación de la expresión génica con este tratamiento enzimático.

Consideraciones:

En un futuro estudio podría plantearse la opción de estudiar fibroblastos derivados de Apert apareados con controles sanos para tener un panorama más amplio de los efectos del tratamiento de degradación enzimática de la molécula de HS.

Igualmente debe realizarse la verificación de la degradación del Heparán Sulfato mediante otras metodologías como la inmunohistoquímica que garantice el cumplimiento de este proceso.

A. Anexo: Consentimiento informado para inclusión de pacientes en estudio



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

IMPACTO DE LA DEGRADACION DE HEPARAN SULFATO EN LOS PERFILES DE EXPRESION DOWNSTREAM DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON MUTACIONES P253R EN FGFR2



EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL PACIENTE Y SU FAMILIA

OBJETIVO- ¿QUÉ BUSCA ESTE ESTUDIO?

El síndrome de Apert es una enfermedad genética causado por mutaciones en el gen FGFR2, sin embargo existe aún una gran cantidad de interrogantes sobre cómo se presenta el daño en las células afectadas de la región craneal. Adicional a esto, no existe en la actualidad una terapia farmacológica que permita disminuir o eliminar la sintomatología de la enfermedad. Este estudio busca explorar algunas vías moleculares que intervienen en el desarrollo de esta patología y por otro lado, proponer un abordaje farmacológico para mejorar el ambiente celular de ese tejido afectado

PROCEDIMIENTO-¿QUÉ LE PEDIMOS?

Su hijo, o menor a cargo, tiene características que hace pensar que puede cursar con el Síndrome de Apert, el cual estamos estudiando.

Si permite su participación en este estudio, se procederá a tomar una muestra de sangre (7cc en el brazo) y unas muestras de orina, cuando el paciente este hospitalizado y usando las vías venosas por donde ingresa el suero. Además se tomará un fragmento de tejido óseo craneal, que sea descartado en el momento en que se esté corrigiendo quirúrgicamente el defecto en su hijo. Por lo tanto, todas estas muestras se tomarán al mismo tiempo en que se está siendo manejado hospitalariamente al paciente.

Las muestras serán enviadas posteriormente al Instituto de Genética de la Universidad Nacional para la realización de los estudios. Luego de ello, con las muestras de sangre, orina y tejido de hueso, continuaremos hacia la búsqueda de la mutación P253R en el gen FGFR2 y posterior a ello el análisis

de varios procesos moleculares en dicha muestras.

El riesgo de la toma de esta muestra de sangre y orina es mínimo y no se han descrito situaciones adversas que afecten la salud su hijo como consecuencia de este procedimiento.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo ya que se emplearan muestra de tejidos que se toman en procedimientos programado para el manejo de la condición clínica presente en el paciente y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestras, y como se explicó arriba los riesgos son pocos y pueden incluir dolor leve, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

BENEFICIOS ADICIONALES: Este estudio tiene para usted el (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es): 1. Detección de la mutación P253R del gen FGFR2 en su hijo o menor a cargo, en el caso que la tuviese. 2. Proporcionar más información a la comunidad científica, sobre los mecanismos de desarrollo de esta enfermedad 3. Colaborar en el proceso de propuesta de desarrollo de terapias en este tipo de craneosinostosis (Defecto craneal)

MANEJO DE RESULTADOS: Los resultados de las pruebas serán facilitados a usted si así lo desea.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE: En el curso del estudio se le suministrará a usted cualquier tipo de información nueva, derivada de éste, que pueda modificar su participación en el mismo. Las muestras e información que usted aportó serán empleadas para el desarrollo de ESTA investigación.

Solo en algunos casos, la información y muestras suministradas por usted se pueden emplear en otros estudios clínicos o de ciencias básicas. SIEMPRE SE LE PEDIRÁ una autorización por escrito en caso de que usted autorice que su información o la información y muestras DEL MENOR A SU CARGO, sean empleadas en otros estudios. Por ello le solicitamos que revise el formato de AUTORIZACIÓN donde usted puede aprobar o rechazar el empleo de la información y muestras en las circunstancias allí mencionadas.

Usted podrá, en el momento que lo desee, retirar las muestras del almacenamiento.

Si usted cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación o desea cualquier información adicional, por favor llame a los teléfonos mencionados más adelante.

INVITACION A PARTICIPACION EN EL PROYECTO.

Usted y su hijo o menor a cargo, está siendo invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD - HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO DE SAN JOSE Y EL HOSPITAL MILITAR CENTRAL.** Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

(a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.

(b) Este estudio puede generar beneficios directos sobre usted y su familia, ya que en algunos pacientes se detectarán mutaciones en el gen FGFR2. Con los datos obtenidos en este estudio podremos conocer más sobre el desarrollo del Síndrome de APERT y se podría a futuro ofrecer determinadas alternativas terapéuticas.

(c) Usted en nombre del menor a su cargo puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocatoria de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente ni consecuencia alguna en la calidad de atención médica que se le suministre.

(d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación.

(e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

(f) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted.

(g) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

(h) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida y explicada por el grupo investigador. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, contestará sus preguntas.

Para mayor información, llame en Colombia al 3165000 EXT 11631, para comunicarse con el investigador Dr. Harvy Velasco Parra, en el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional, Carrera 44 #26-85 y al correo por Internet: hmvelascop@unal.edu.co, o a la **oficina de investigaciones Hospital Militar Central**

Adicionalmente, si usted no está satisfecho con la forma como se está conduciendo este estudio o tiene otras preguntas concernientes a sus derechos como participante del estudio, por favor contacte al mismo teléfono o correo electrónico mencionados antes.

AUTORIZACION

El ingreso a este estudio es voluntario. Usted tiene derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. Los investigadores guardarán las muestras de sangre y tejido para realizar estudios sobre el **IMPACTO DE LA DEGRADACION DE HEPARAN SULFATO EN LOS PERFILES DE EXPRESION DOWNSTREAM DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON MUTACIONES P2353R EN FGFR2**

Una vez terminado este trabajo, requerimos de su autorización para:

- Ser almacenadas para emplearlas en estudios de investigación Si No nacionales e internacionales de patologías relacionadas con la entidad objeto de esta investigación (Síndrome de Apert), siempre y cuando se

conserve en anonimato mis datos de identificación y los del menor a mi cargo. En el caso que su respuesta sea afirmativa, el grupo de investigación se compromete a contactarse con usted y solicitar una nueva autorización, previa autorización del comité de Ética de la Universidad Nacional y de Ética e Investigación en Seres Humanos del Hospital Infantil Universitario de San José para proteger la integridad del sujeto de estudio

- Ser desechadas una vez terminado este trabajo, mediante incineración y Si No se tendrá un registro de desecho de muestras

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: "IMPACTO DE LA DEGRADACION DE HEPARAN SULFATO EN LOS PERFILES DE EXPRESION DOWNSTREAM DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON MUTACIONES P2353R EN FGFR2"

Yo, _____ identificado con documento numero _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome a mi o a mi hijo (a) o menor a mi cargo, cuyo nombre es _____ muestras de _____, con el fin de almacenarlas para el estudio molecular en el Síndrome de Apert. Así mismo, declaro que se me ha explicado Y HE ENTENDIDO la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Firma del padre

Nombre: _____
Identif: _____
Teléfono: _____
Dirección: _____

Firma de la madre

Nombre: _____
Identif: _____
Teléfono: _____
Dirección: _____

Responsable del menor

Nombre: _____
Identif: _____
Teléfono: _____

Sujeto de investigación (mayor de 7 años)

Dirección: _____

Testigo 1

Nombre: _____

Identif: _____

Teléfono: _____

Dirección: _____

Testigo 2

Nombre: _____

Identif: _____

Teléfono: _____

Dirección: _____

Fecha: _____

Investigador

Teléfono: _____

Dirección: _____

Bibliografía

1. Kimonis V, Gold J-A, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA, editors. Genetics of craniosynostosis. Seminars in pediatric neurology; 2007: Elsevier.
2. Muenke M, Wilkie A. Craniosynostosis syndromes. The metabolic and molecular bases of inherited disease New York: McGraw-Hill. 2001:6117-46.
3. Ibrahim OA, Chiu ES, McCarthy JG, Mohammadi M. Understanding the molecular basis of Apert syndrome. Plastic and reconstructive surgery. 2005;115(1):264-70.
4. Cohen MM. Editorial: perspectives on craniosynostosis. American Journal of Medical Genetics Part A. 2005;136(4):313-26.
5. Apert M. De l'acrocephalosyndactylie. Bull Soc Med Hop (Paris). 1906;23:1310-30.
6. Tolarova MM, Harris JA, Ordway DE, Vargervik K. Birth prevalence, mutation rate, sex ratio, parents' age, and ethnicity in Apert syndrome. American journal of medical genetics. 1997;72(4):394-8.
7. Wilkie AO. Epidemiology and genetics of craniosynostosis. American journal of medical genetics. 2000;90(1):82-3.
8. Carmichael SL. Birth defects epidemiology. European journal of medical genetics. 2014;57(8):355-8.
9. Velasco HM, Ramírez D, Pineda T, Piñeros L, Vinasco T, Contreras G, et al. Genotypic analysis of 11 Colombian Apert syndrome patients. Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. 2013;61(1):35-40.

10. McCandless SE, Brunger JW, Cassidy SB. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74(1):121-7.
11. Agochukwu NB, Solomon BD, Muenke M. Impact of genetics on the diagnosis and clinical management of syndromic craniosynostoses. *Child's Nervous System*. 2012;28(9):1447-63.
12. Cohen MM, Kreiborg S. Skeletal abnormalities in the Apert syndrome. *American journal of medical genetics*. 1993;47(5):624-32.
13. Cohen MM, Kreiborg S. Suture formation, premature sutural fusion, and suture default zones in Apert syndrome. *American journal of medical genetics*. 1996;62(4):339-44.
14. Eswarakumar VP, Horowitz MC, Locklin R, Morriss-Kay GM, Lonai P. A gain-of-function mutation of *Fgfr2c* demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(34):12555-60.
15. Eswarakumar VP, Monsonogo-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM, Lonai P. The *Il1c* alternative of *Fgfr2* is a positive regulator of bone formation. *Development*. 2002;129(16):3783-93.
16. Wang Y, Xiao R, Yang F, Karim BO, Iacovelli AJ, Cai J, et al. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome *FGFR2+/S252W* mouse. *Development*. 2005;132(15):3537-48.
17. Yin L, Du X, Li C, Xu X, Chen Z, Su N, et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (*Fgfr2*) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Bone*. 2008;42(4):631-43.
18. Heuzé Y, Singh N, Basilico C, Jabs EW, Holmes G, Richtsmeier JT. Morphological comparison of the craniofacial phenotypes of mouse models expressing the Apert *FGFR2 S252W* mutation in neural crest-or mesoderm-derived tissues. *Bone*. 2014;63:101-9.
19. Jones KL, Jones MC, Del Campo M. *Smith's recognizable patterns of human malformation*: Elsevier Health Sciences; 2013. 474-7 p.

-
20. Esparza J, Hinojosa J, Garcia-Recuero I, Romance A, Pascual B, de Aragón AM. Surgical treatment of isolated and syndromic craniosynostosis. Results and complications in 283 consecutive cases. *Neurocirugia*. 2008;19(6):509-29.
 21. Shen W, Cui J, Chen J, Weiping S. Molding of Top Skull in the Treatment of Apert Syndrome. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015;26(2):516-7.
 22. Passos-Bueno M, Sertie A, Jehee F, Fanganiello R, Yeh E. Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. 2008.
 23. Robin NH, Falk MJ, Haldeman-Englert CR. FGFR-related craniosynostosis syndromes. 2011.
 24. Oberoi S, Hoffman WY, Vargervik K. Craniofacial team management in Apert syndrome. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2012;141(4):S82-S7.
 25. Allam KA, Wan DC, Khwanngern K, Kawamoto HK, Tanna N, Perry A, et al. Treatment of Apert syndrome: a long-term follow-up study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2011;127(4):1601-11.
 26. Carter EP, Fearon AE, Grose RP. Careless talk costs lives: fibroblast growth factor receptor signalling and the consequences of pathway malfunction. *Trends in cell biology*. 2015;25(4):221-33.
 27. Moloney DM, Slaney SR, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, et al. Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nature genetics*. 1996;13(1):48-53.
 28. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development*. 2002;16(12):1446-65.
 29. Chen P, Zhang L, Weng T, Zhang S, Sun S, Chang M, et al. A Ser252Trp mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) mimicking human Apert syndrome reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of endochondral bone formation. 2014.
 30. Marie P, Coffin J, Hurley M. FGF and FGFR signaling in chondrodysplasias and craniosynostosis. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;96(5):888-96.

31. Gorlin R. Fibroblast growth factors, their receptors and receptor disorders. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 1997;25(2):69-79.
32. Marie PJ, Miraoui H, Sévère N. FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors*. 2012;30(2):117-23.
33. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene*. 2012;498(1):1-4.
34. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2015;4(3):215-66.
35. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(2):233-47.
36. Eswarakumar V, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(2):139-49.
37. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
38. Mansukhani A, Dell'Era P, Moscatelli D, Kornbluth S, Hanafusa H, Basilico C. Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(8):3305-9.
39. Yayon A, Zimmer Y, Shen G, 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. *The EMBO journal*. 1992;11(5):1885.
40. Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AO, Heath JK. Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Human molecular genetics*. 1998;7(9):1475-83.

-
41. Belov AA, Mohammadi M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(6).
 42. Liu C, Cui Y, Luan J, Zhou X, Han J. The molecular and cellular basis of Apert syndrome. *Intractable & Rare Diseases Research*. 2013;2(4):115.
 43. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):116-29.
 44. Marie PJ. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(7):1347-61.
 45. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(3):166-80.
 46. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 2000;22(2):108-12.
 47. Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Current opinion in genetics & development*. 2013;23(4):399-407.
 48. Xu D, Esko JD. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annual review of biochemistry*. 2014;83:129-57.
 49. Nieto L, Canales Á, Fernández IS, Santillana E, González-Corrochano R, Redondo-Horcajo M, et al. Heparin modulates the mitogenic activity of fibroblast growth factor by inducing dimerization of its receptor. A 3D view by using NMR. *ChemBioChem*. 2013;14(14):1732-44.
 50. Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes & Diseases*. 2014;1(2):199-213.
 51. Li B, Qu C, Chen C, Liu Y, Akiyama K, Yang R, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling. *Oral diseases*. 2012;18(3):285-92.

-
52. Holmes G. Mouse models of Apert syndrome. *Child's Nervous System*. 2012;28(9):1505-10.
53. Holmes G, Rothschild G, Roy UB, Deng C-X, Mansukhani A, Basilico C. Early onset of craniosynostosis in an Apert mouse model reveals critical features of this pathology. *Developmental biology*. 2009;328(2):273-84.
54. Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(8):4897-904.
55. Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer research*. 2008;68(7):2340-8.
56. Semrad TJ, Mack PC. Fibroblast growth factor signaling in non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*. 2012;13(2):90-5.
57. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(2):116-29.
58. Jorgen W, Kaisa H, Ellen MH. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochemical Journal*. 2011;437(2):199-213.
59. Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):709-24.
60. Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM, Mohammadi M. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(13):7182-7.
61. Choi S-C, Kim S-J, Choi J-H, Park C-Y, Shim W-J, Lim D-S. Fibroblast growth factor-2 and-4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem cells and development*. 2008;17(4):725-36.

-
62. Zhang L, Chen P, Chen L, Weng T, Zhang S, Zhou X, et al. Inhibited Wnt Signaling Causes Age-Dependent Abnormalities in the Bone Matrix Mineralization in the Apert Syndrome FGFR2S252W/+ Mice. *PLoS one*. 2015;10(2).
63. Teplyuk NM, Haupt LM, Ling L, Dombrowski C, Mun FK, Nathan SS, et al. The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;107(1):144-54.
64. Brusgard JL, Passaniti A. RUNX2 Transcriptional Regulation in Development and Disease. *Nuclear Signaling Pathways and Targeting Transcription in Cancer*: Springer; 2014. p. 57-86.
65. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(3):750-5.
66. Baroni T, Carinci P, Lilli C, Bellucci C, Aisa MC, Scapoli L, et al. P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *Journal of cellular physiology*. 2005;202(2):524-35.
67. Naganawa T, Xiao L, Coffin J, Doetschman T, Sabbieti MG, Agas D, et al. Reduced expression and function of bone morphogenetic protein-2 in bones of Fgf2 null mice. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;103(6):1975-88.
68. Jiang T, Ge S, Shim YH, Zhang C, Cao D. Bone morphogenetic protein is required for fibroblast growth factor 2-dependent later-stage osteoblastic differentiation in cranial suture cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):2946-54.
69. Marek L, Ware KE, Fritzsche A, Hercule P, Helton WR, Smith JE, et al. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells. *Molecular pharmacology*. 2009;75(1):196-207.
70. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(7):1855-62.
71. Bodo M, Carinci F, Baroni T, Giammarioli M, Bellucci C, Bosi G, et al. Apert's syndrome: differential in vitro production of matrix macromolecules and its regulation by interleukins. *European journal of clinical investigation*. 1997;27(1):36-42.

-
72. Bodo M, Lilli C, Aisa MC, Scapoli L, Bellucci C, Rinaldi E, et al. Basic fibroblast growth factor: effects on matrix remodeling, receptor expression, and transduction pathway in human periosteal fibroblasts with FGFR2 gene mutation. *Journal of interferon & cytokine research*. 2002;22(6):621-30.
73. Carinci F, Pezzetti F, Locci P, Becchetti E, Carls F, Avantiaggiato A, et al. Apert and Crouzon syndromes: clinical findings, genes and extracellular matrix. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005;16(3):361-8.
74. Carinci F, Bodo M, Tosi L, Francioso F, Evangelisti R, Pezzetti F, et al. Expression profiles of craniosynostosis-derived fibroblasts. *Molecular medicine*. 2002;8(10):638.
75. Yang YS, Oh W, Lee JY, Choi SJ, Jeon HB, Kim J-Y, et al. Hair growth promoting capacity of conditioned media of stimulated stem cells and use thereof. *Google Patents*; 2015.
76. Freshney RI. *Culture of specific cell types*: Wiley Online Library; 2005.
77. Ko JM. Genetic Syndromes Associated with Craniosynostosis. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2016;59(3):187-91.
78. Stamper BD, Park SS, Beyer RP, Bammler TK, Farin FM, Mecham B, et al. Differential expression of extracellular matrix-mediated pathways in single-suture craniosynostosis. *PLoS one*. 2011;6(10):e26557.
79. Fanganiello RD, Sertié AL, Reis EM, Yeh E, Oliveira NA, Bueno DF, et al. Apert p. Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. *MOLECULAR MEDICINE-CAMBRIDGE MA THEN NEW YORK*-. 2007;13(7/8):422.
80. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8(1):175-93.
81. Qin L-X, Beyer RP, Hudson FN, Linford NJ, Morris DE, Kerr KF. Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC bioinformatics*. 2006;7(1):1.

-
82. Murali R, Chandramohan R, Möller I, Scholz SL, Berger M, Huberman K, et al. Targeted massively parallel sequencing of angiosarcomas reveals frequent activation of the mitogen activated protein kinase pathway. *Oncotarget*. 2015;6(34):36041-52.
83. Takeuchi T, Misaki A, Liang SB, Tachibana A, Hayashi N, Sonobe H, et al. Expression of T-Cadherin (CDH13, H-Cadherin) in Human Brain and Its Characteristics as a Negative Growth Regulator of Epidermal Growth Factor in Neuroblastoma Cells. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(4):1489-97.
84. Rushworth LK, Kidger AM, Delavaine L, Stewart G, Van Schelven S, Davidson J, et al. Dual-specificity phosphatase 5 regulates nuclear ERK activity and suppresses skin cancer by inhibiting mutant Harvey-Ras (HRasQ61L)-driven SerpinB2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(51):18267-72.
85. Kim JH, Yoon SM, Song SU, Park SG, Kim W-S, Park IG, et al. Hypoxia Suppresses Spontaneous Mineralization and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via IGFBP3 Up-Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(9):1389.
86. Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(26):14536-41.
87. Yeh E, Atique R, Ishiy FA, Fanganiello RD, Alonso N, Matushita H, et al. FGFR2 mutation confers a less drastic gain of function in mesenchymal stem cells than in fibroblasts. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2012;8(3):685-95.
88. Miraoui H, Ringe J, Häupl T, Marie PJ. Increased EFG-and PDGF α -receptor signaling by mutant FGF-receptor 2 contributes to osteoblast dysfunction in Apert craniosynostosis. *Human molecular genetics*. 2010:ddq045.
89. Grassmann F, Friedrich U, Fauser S, Schick T, Milenkovic A, Schulz HL, et al. A candidate gene association study identifies DAPL1 as a female-specific susceptibility locus for age-related macular degeneration (AMD). *Neuromolecular medicine*. 2015;17(2):111-20.

-
90. McDowell LM, Frazier BA, Studelska DR, Giljum K, Chen J, Liu J, et al. Inhibition or activation of Apert syndrome FGFR2 (S252W) signaling by specific glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(11):6924-30.