



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA ACONDROPLASIA EN 20 PACIENTES COLOMBIANOS

Mutational analysis of achondroplasia in 20 Colombian patients

Ángela Castro¹, Andrés Gutiérrez², Luisa Fernanda Rodríguez³, Tatiana Pineda³, Harvy Velasco⁴, Clara Arteaga⁵, Hugo Sotomayor⁶, Alejandro Giraldo⁷

1. MD. Investigador Joven, Colciencias -Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
2. Biólogo MSc. Fundación Guillo, Bogotá, Colombia.
3. Estudiante XI Semestre, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
4. MD. Especialista en Genética Médica, Profesor Asistente, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.
5. MD. MSc. Profesor Asociado. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
6. Profesor Asociado. Facultad de Medicina, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia.
7. MD. MPH. Profesor Asociado. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Director Fundación Guillo. Bogotá.

Correspondencia: agiraldori@unal.edu.co

Resumen

Antecedentes. La acondroplasia es la más común de las displasias esqueléticas. Se trata de una enfermedad autosómica dominante con penetrancia completa. Esta enfermedad se debe a una mutación en el gen del receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3). El 90% o más de los casos se deben a mutaciones nuevas que se originan en las células germinales de padres sanos, asociada a una edad incrementada. Se ha calculado una frecuencia al nacimiento de 1:10.000 a 1:30.000. En la mayoría de los casos (97%) la mutación presente es la transición G1138A, en el dominio transmembranal de gen. En el resto se presenta la transversión en el mismo nucleótido, G1138C.

Objetivo. Detectar mutaciones del gen FGFR3 en un grupo de pacientes colombianos con acondroplasia.

Material y métodos. Estudiamos un grupo de 20 pacientes con diagnóstico clínico de acondroplasia. Se utilizó el método, ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction) que

emplea dos pares *primers* diseñados específicamente para amplificar respectivamente los dos diferentes nucleótidos de una mutación puntual.

Resultados. 19 pacientes (95%), presentaron la mutación G1138A y un paciente presentó la mutación G1138C (5%).

Conclusión. No obstante la acondroplasia presentar un fenotipo considerado distinguible de otras displasias esqueléticas, algunas veces la hipocondroplasia, que se presenta por mutaciones en el mismo gen FGFR3, puede ser difícil de discriminar clínicamente, por lo que el análisis mutacional permite la correcta clasificación, así como de eventualmente otras displasias esqueléticas por mutaciones en otros genes.

Palabras claves: análisis mutacional de ADN, acondroplasia, anomalías autosómicas, mutación, fenotipo.

Castro A, Gutiérrez A, Rodríguez LF, Pineda T, Velasco H, Arteaga C, Sotomayor H, Giraldo A. Análisis mutacional de la acondroplasia en 20 pacientes colombianos. *Rev.Fac.Med.* 2010; 58: 185-190.



Summary

Background. Achondroplasia is the most common skeletal dysplasia, mainly affecting tubular bones, vertebrae and skull. This is an autosomal dominant syndrome with complete penetrance, due to a mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene. Approximately 90% of the achondroplasia cases, are due to new mutations in the germ cells of otherwise normal fathers. Increased paternal age has been documented. It has been calculated a birth frequency of achondroplasia from 1:10.000 to 1:30.000. Most of the mutations causing achondroplasia (97%) is a transition G1138A in the transmembranal domain of the gene. The rest is a transversion in the same nucleotide, G1138C. Rarely other mutations type are present.

Objective. To detect the mutations causing achondroplasia in a group of Colombian patients.

Materials and methods. 20 patients with clinical diagnosis of achondroplasia were studied. The method,

ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) was used. This method employs two primers pairs to amplify, respectively.

Results. 19 patients (95%), presented the mutation G1138A and one patient presented the mutation G1138C.

Conclusions. Notwithstanding achondroplasia has a conspicuous phenotype, distinguishable from other skeletal dysplasias, sometimes hypochondroplasia, due to mutations in the same FGFR3 gene, could be difficult to discriminate. For that reason the mutational analysis is fundamental for the correct classification of these allelic forms. Or eventually, from other skeletal dysplasias due to other genes.

Key words: DNA mutational analysis, achondroplasia, chromosome aberrations, mutation, phenotype.

Castro A, Gutiérrez A, Rodríguez LF, Pineda T, Velasco H, Arteaga C, Sotomayor H, Giraldo A. Mutational analysis of achondroplasia in 20 Colombian patients. *Rev.Fac.Med.* 2010; 58: 185-190.

Introducción

La acondroplasia es la más común de las displasias esqueléticas, la cual afecta principalmente los huesos tubulares, la columna y el cráneo, manifestándose en acortamiento rizomélico de miembros superiores e inferiores, lordosis lumbar y macrocefalia con abombamiento frontal, con una frecuencia al nacimiento de 1:10.000 a 1:30.000 (1). Con frecuencia se presenta otitis media y en el 5 a 10% de los casos se presentan otros problemas relacionados con hidrocefalia, compresión de la unión cráneo-cervical, obstrucción de las vías respiratorias o cifosis toracolumbar (2). La muerte súbita se presenta en alrededor del 7% de los casos por compresión de la médula espinal cervical (3,4). Se trata de una enfermedad autosómica dominante con penetrancia completa debida a una mutación en el gen del “receptor 3 del factor de crecimiento

fibroblástico” (FGFR3) localizado en 4p16.3.1 (5,6). El 90% o más de los casos se deben a mutaciones nuevas que se presentan en las células germinales de padres sanos, demostrándose en varios estudios una edad paterna incrementada y que la mutación es exclusivamente del alelo paterno (7,8). En la mayoría de los casos (98%), la mutación presente es la transición G1138A, de gen, en el resto se presenta la transversión en el mismo nucleótido, G1138C, ambas generando un cambio de glicina por arginina en la posición 380 en el dominio transmembranal de la proteína (5,6). Excepcionalmente se presentan otras mutaciones en ese mismo dominio, o en otras regiones del gen.

Material y métodos

Se estudiaron 19 casos esporádicos y un caso heredado, de pacientes con diagnóstico clínico de

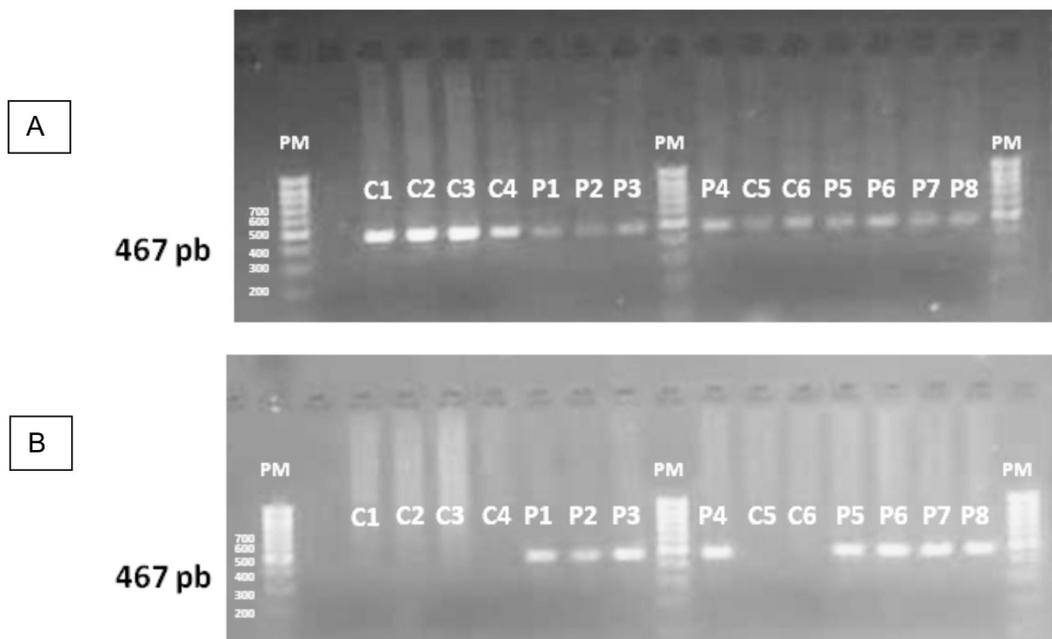


Figura 1. A. En los carriles correspondientes a los controles sanos (C), se evidencia la amplificación marcada del los alelos normales G1138, pues son homocigotos para este alelo. En los pacientes acondroplásicos (P) se evidencia la amplificación, más tenue, del alelo normal G1138, pues son heterocigotos para este alelo y el alelo anormal. B. En los carriles correspondientes a los pacientes (P), se evidencia la amplificación del alelo mutado 1138A. En los carriles correspondientes a los controles no se evidencia amplificación, pues esta solo es para el alelo mutado.

acondroplasia. A los pacientes se le tomó una muestra de sangre después de firmado un consentimiento informado, directamente por ellos en el caso de los adultos o por sus padres o tutores legales en el casos de los menores de edad. Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y cumple con lo estipulado en el Acuerdo 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. De estos pacientes, 10 pertenecen a la Asociación Pequeños Gigantes de Colombia (asociacionpgc@yahoo.com).

Se aisló el ADN de linfocitos de sangre periférica por el método de extracción salina (*salting out*) (9). El ADN se amplificó mediante la metodología ARMS (*Amplification refractory mutation system*) que emplea dos *primers* diseñados específicamente para amplificar respectivamente los dos diferentes nucleótidos de una mutación puntual (o alelos de un SNP) (10). La

electroforesis de los productos amplificados se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,5% o de poliacrilamida al 12%.

Resultados

En la figura 1 se detalla el análisis molecular con la técnica ARMS de los pacientes acondroplásicos comparados con individuos controles sanos. En la tabla 1 se describen el género, la edad de los pacientes (rango, 1 día a 53 años), la edad de los padres al nacimiento de los casos esporádicos y las mutaciones encontradas.

Discusión

De los 20 pacientes con acondroplasia, 19 fueron casos esporádicos (mutaciones nuevas) y uno (ACH 19) es un caso hereditario, hijo de



Tabla 1. Género, edad de los pacientes y de los padres, casos esporádicos al nacimiento y mutaciones encontradas

N°	Paciente	Edad	Género	Edad paterna	Dx. Molecular
1	ACH1	1d	M	30	1138G/1138A
2	ACH2	5m	F	39	1138G/1138A
3	ACH3	48a	F	65	1138G/1138A
4	ACH4	53a	F	26	1138G/1138A
5	ACH5	1a	M	31	1138G/1138A
6	ACH6	9m	F	39	1138G/1138A
7	ACH7	22a	F	19	1138G/1138A
8	ACH8	3m	M	41	1138G/1138A
9	ACH9	5m	M	36	1138G/1138A
10	ACH11	10m	F	31	1138G/1138A
11	ACH13	3d	F	31	1138G/1138A
12	ACH14	5a	M	40	1138G/1138A
13	ACH15	22a	F	-	1138G/1138A
14	ACH16	19a	F	-	1138G/1138A
15	ACH17	11a	M	23	1138G/1138C
16	ACH19	7a	M	22	1138G/1138A
17	ACH22	14a	M	-	1138G/1138A
18	ACH25	1a	F	34	1138G/1138A
19	ACH26	4m	F	31	1138G/1138A
20	ACH27	16a	M	-	1138G/1138A

una madre afectada, no incluida en este estudio, once pacientes pertenecen al género femenino y nueve al masculino lo que está en concordancia con la paridad de géneros observada en las enfermedades monogénicas. El rango de edad varió de un día de nacido hasta los 53 años, pues tenemos relaciones con hospitales materno infantiles y vimos pacientes asociados en grupos de baja talla que colaboró con este estudio. La edad paterna de los casos esporádicos varió de 19 a 65 años (promedio 34,3 años). Esta edad es significativamente mayor ($p < 0,05$) que la edad promedio observada en los padres de 245 controles sanos (28,21 años), en un estudio epidemiológico de anomalías congénitas en Bogotá (11).

En 19 pacientes (95%), la mutación presente es la transición G por A en el nucleótido 1138 que se expresa en el dominio transmembranal de la proteína. Un paciente (ACH 17), el 5%, pre-

sentó la transversión G por C en el mismo nucleótido. Ambas mutaciones generan un cambio en el primer nucleótido (1138) del codón GGG que normalmente codifica para una glicina en la posición 380 de la proteína. Ambas mutaciones, la transición (AGG, una purina por una purina), y la transversión (CGG, una purina por una pirimidina) cambian igualmente el codón 380 de glicina a arginina. Estas mismas mutaciones son las presentes en prácticamente todos los estudios moleculares de la acondroplasia, en los países que han analizado molecularmente esta patología, tanto en poblaciones estadounidenses (5,12) como en poblaciones europeas: Francia (6,13) y España (14,15) y asiáticas: China (16), Japón (17) e India (18).

En Latinoamérica, sólo se encontró un estudio chileno que demostró las mismas mutaciones en un grupo de cuatro pacientes (19). Por ser esta la misma mutación presente en la gran mayoría

de los estudios del mundo, se ha considerado como una de las más frecuentes, sino la más frecuente del genoma humano (20).

El asesoramiento genético ofrecido a los padres de los casos esporádicos que asistieron a la consulta, fue el relacionado con el bajo riesgo de repetición en una futura gestación, dado que la mayoría de las veces se considera que se deben a una mutación nueva, evento que tendría una probabilidad de recurrencia extraordinariamente baja.

Sin embargo, se ha observado que padres sanos de hijos acondroplásicos, han vuelto a tener hijos con esta patología, por lo cual desde antes del desarrollo de la biología molecular, se propuso que estos casos se explicaban por la presencia en los padres de un mosaicismo germinal, es decir, que estos individuos poseen dos tipos de células germinales: normales y portadoras de la mutación (21,22). Más recientemente, estos eventos han sido demostrados plenamente a nivel molecular (23-25). Debido a este fenómeno del mosaicismo gonadal, se ha calculado que el riesgo de repetición es de 1/443, o del 0.02%, el cual es sustancialmente mayor al esperado por recurrencia de mutaciones nuevas (26).

Por esta razón se recomienda también a los padres de estos pacientes considerar el diagnóstico prenatal por ecografía y eventualmente en líquido amniótico, por métodos moleculares, en las gestaciones subsiguientes (16,27).

Se resalta la importancia del diagnóstico molecular de la acondroplasia, pues aunque esta entidad presenta un cuadro clínico evidente en la mayoría de los casos, en algunas ocasiones no es fácil separarla de la hipocondroplasia, la cual presenta una mutación en el mismo gen, pero en otros codones (12,15,19), los que también son objeto de investigación en nuestro gru-

po. Estos estudios moleculares son particularmente críticos en el diagnóstico prenatal, cuando se evidencia una displasia esquelética por ecografía (27).

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Ingeniero Carlos Dueñas, Fundador y Director de la Asociación Pequeños Gigantes de Colombia y al Doctor Harry Pachajoa de la Universidad del Valle por el envío de un paciente.

Financiación

DIB, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Colciencias a través del Programa Jóvenes Investigadores.

Referencias

1. **Horton WA, Hall JG, Hecht JT.** Achondroplasia. *Lancet.* 2007; 370: 162-172.
2. **Trotter TL, Hall JG.** Health supervision for children with achondroplasia. *Pediatrics.* 2005;116: 771-83.
3. **Pauli RM, Scott CI, Wassman ER Jr, Gilbert EF, Leavitt LA, Ver Hoeve J, et al.** Apnea and sudden unexpected death in infants with achondroplasia. *J Pediatr.* 1984;104: 342- 348.
4. **Hecht JT, Francomano CA, Horton WA, Annegers JF.** Mortality in achondroplasia. *Am J Hum Genet.* 1987; 41: 454-464.
5. **Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, et al.** Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell.* 1994;78: 335-342.
6. **Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al.** Mutations in the gene encoding fibroblast receptor growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 1994; 371: 252-254.
7. **Orioli IM, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo PP.** Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet.* 1995; 59: 209-217.



8. **Wilkin DJ, Szabo JK, Cameron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, et al.** Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet.* 1998; 63: 711-716.
9. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 1988; 16: 1215.
10. **Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17: 2503-2516.
11. **García H, Salguero GA, Moreno J, Arteaga C, Giraldo A.** Frecuencia de anomalías congénitas en el Instituto Materno Infantil de Bogotá Biomédica. 2003; 23: 161-172.
12. **Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ.** The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev.* 2000; 21: 23-39.
13. **Baujat G, Legeai-Mallet L, Finidori G, Cormier-Daire V, Le Merrer M.** Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008; 22: 3-18.
14. **Climent C, Lorda-Sánchez I, Urioste M, Gairi JM, Rodríguez JI, Rubio V.** Achondroplasia: estudio molecular de 28 pacientes. *Med Clin (Barc).* 1998; 110: 492-494.
15. **Ezquieta-Zubicaray B, Iguacel AO, Varela-Junquera JM, Jariego-Fente CM, González-Gancedo P, Gracia-Bouthelie R.** Análisis de las mutaciones Gly380Arg y Asn540Lys del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos en la achondroplasia y la hipocondroplasia en la población española. *Med Clin (Barc).* 1999;112: 290-293.
16. **Niu DM, Hsiao KJ, Wang NH, Chin LS, Chen CH.** Chinese achondroplasia is also defined by recurrent G380R mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene. *Hum Genet.* 1996; 98: 65-67.
17. **Katsumata N, Mikami S, Nagashima-Miyokawa A, Nimura A, Sato N, Horikawa R, et al.** Analysis of the FGFR3 gene in Japanese patients with achondroplasia and hypochondroplasia. *Endocr J.* 2000; 47: S121-4.
18. **Patil SJ, Banerjee M, Phadke SR, Mittal B.** Mutation analysis in Indian children with achondroplasia - utility of molecular diagnosis. *Indian J Pediatr.* 2009;76:147-9.
19. **Mancilla EE, Poggi H, Repetto G, García C, Foradori A, Cattani A.** Mutaciones del gen del receptor 3 del Factor de Crecimiento de Fibroblasto (FGFR3) en pacientes chilenos con talla baja idiopática, hipocondroplasia y acondroplasia. *Rev Med Chil.* 2003; 131: 1405-1410.
20. **Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M, et al.** Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet.* 1995;56:368-73.
21. Bowen P. Achondroplasia in two sisters with normal parents. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1974;10:31-6.
22. **Fryns JP, Kleczkowska A, Verresen H, van den Berghe H.** Germinal mosaicism in achondroplasia: a family with 3 affected sibs of normal parents. *Clin Genet.* 1983; 24: 156-158.
23. **Henderson S, Silience D, Loughlin J, Bennetts B, Sykes B.** Germline and somatic mosaicism in achondroplasia. *J Med Genet.* 2000; 37: 956-958.
24. **Natacci F, Baffico M, Cavallari U, Bedeschi MF, Mura I, Paffoni A, Setti PL, et al.** Germline mosaicism in achondroplasia detected in sperm DNA of the father of three affected sibs. *Am J Med Genet A.* 2008;146A:784-6.
25. **Dakouane Giudicelli M, Serazin V, Le Sciellour CR, Albert M, Selva J, Giudicelli Y.** Increased achondroplasia mutation frequency with advanced age and evidence for G1138A mosaicism in human testis biopsies. *Fertil Steril.* 2008; 89: 165-166.
26. **Mettler G, Fraser FC.** Recurrence risk for sibs of children with sporadic achondroplasia. *Am J Med Genet.* 2000; 90: 250-251.
27. **Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Carrillo Redondo A, Ramos-Corrales C, et al.** Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to FGFR3 gene mutations: a 9-year experience : prenatal diagnosis in FGFR3 gene. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26: 455-460.