

Síndrome de Crouzon con acantosis *nigricans*

P. Lapunzina^a, M.^aC. Fernández^b, J.M. Varela Junquera^a, C. Arberas^b,
A.M.^a Tello^b y R. Gracia Bouthelie^c

^aLaboratorio de Biología Molecular. Hospital Universitario La Paz. Madrid. ^bServicio de Genética. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina. ^cServicio de Endocrinología. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

(An Esp Pediatr 2002; 56: 342-346)

El síndrome de Crouzon es una craneosinostosis compleja debida a mutaciones en el receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) tipo 2. Se presenta una paciente de sexo femenino con la asociación de síndrome de Crouzon más acantosis *nigricans* (CAN). El estudio molecular mostró una mutación puntual (Ala391Glu) en el dominio transmembrana de otro FGFR, el tipo 3 (FGFR3) (a escasas bases de distancia de la mutación más frecuente de acondroplasia, la Gly380Arg).

El síndrome de CAN es una entidad recientemente descrita, cuya clínica y alteración molecular es diferente a la del síndrome de Crouzon. Estas diferencias son importantes cuando es necesario establecer una estrategia para realizar estudios moleculares y para el diagnóstico prenatal de esta entidad.

Palabras clave:

Síndrome de Crouzon. Acantosis *nigricans*. Craniosinostosis. Cranioestenosis. FGFR3. Mutación puntual.

CROUZON'S SYNDROME WITH ACANTHOSIS NIGRICANS

Crouzon's syndrome is a complex craniosynostosis disorder due to mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR) type 2.

We report a female patient with Crouzon's syndrome associated with acanthosis *nigricans*. The molecular abnormality in this patient is a point mutation (Ala391Glu) in the transmembrane domain of another FGFR (type 3), which is very close to the mutation (Gly380Arg) most frequently observed in achondroplasia.

Acanthosis *nigricans* is an emerging disorder. Its clinical features and molecular findings differ from those of isolated Crouzon's syndrome. These data are very useful when molecular tests are required for prenatal diagnosis.

Key words:

Crouzon's syndrome. Acanthosis *nigricans*. Craniosinostosis. Cranioostenosis. FGFR3. Point mutation.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Crouzon (SC) descrito por primera vez en 1912¹, es una patología génica de herencia autosómica dominante caracterizado por craneosinostosis que compromete todas las suturas craneales, y ocasiona alteraciones secundarias del macizo facial fácilmente reconocibles por el genetista clínico tras la exploración física.

La acantosis *nigricans* es una patología dermatológica caracterizada por lesiones hiperqueratósicas, hiperpigmentadas y papilomatosas con pequeños tumores papilares, que con frecuencia se observa en los pliegues y zonas de flexión.

La asociación de síndrome de Crouzon con acantosis *nigricans* (CAN) se ha descrito hace más de una década por varios autores²⁻⁵. En 1995 pudo determinarse la mutación específica en un gen, el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3 (*fibroblast growth factor receptor 3*, *FGFR3*), como responsable de esta enfermedad. Dicha mutación es un cambio puntual (transversión C → A) en el nucleótido 1172 del gen *FGFR3*, resultando en un cambio de aminoácido en la posición 391 de la proteína (Ala391Glu)⁶.

De esta forma quedó demostrado que el SC aislado y el síndrome CAN son dos entidades diferentes. La primera se debe a más de 25 mutaciones diferentes en el tercer dominio inmunoglobulina-símil del FGFR2 y la segunda a una única mutación, altamente específica y conservativa en el dominio transmembrana del FGFR3 (fig. 1).

Por otra parte, en el CAN se observaron algunas alteraciones esqueléticas que remedan aquellas presentes en la acondroplasia e hipocondroplasia, dos enfermedades que también están relacionadas con alteraciones moleculares del FGFR3 (tabla 1), tal como la disminución en la distancia interpeduncular en las vértebras lumbares, y otras no relacionadas a acondroplasia e hipocondroplasia como cementomas de mandíbula.

Correspondencia: Dr. P. Lapunzina.

Servicio de Genética. Hospital Universitario La Paz.

P.º de la Castellana, 261. 28046 Madrid.

Correo electrónico: plapunzina@hulp.insalud.es

Recibido en septiembre de 2001.

Aceptado para su publicación en enero de 2002.

Debido a esto, recientemente Cohen⁷ sugirió renombrar al CAN como *Crouzonodermoskeletal syndrome*, incluyendo el fenotipo crouzonoide, la acantosis *nigricans* (dermo) y las alteraciones vertebrales y cementomas de mandíbula (*skeletal*).

Se presenta el caso de una paciente adicional con CAN, con estudio molecular confirmatorio de la enfermedad.

La importancia de diferenciar entre estas dos entidades muy similares radica en realizar estudios moleculares dirigidos, poder determinar riesgos y realizar estudios prenatales en pacientes afectados de este tipo de craneoestenosis.

OBSERVACIÓN CLÍNICA

Se trataba de una paciente de sexo femenino, producto de la segunda gestación de un matrimonio sano, no consanguíneo, edad materna de 32 años y paterna de 47 años que fue evaluado en el Servicio de Genética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires). No existe enfermedad familiar relevante. La hermandad estaba constituida por una niña mayor sana. El embarazo fue controlado, presentó anemia que requirió tratamiento con hierro por vía oral. El parto fue por cesárea por posición

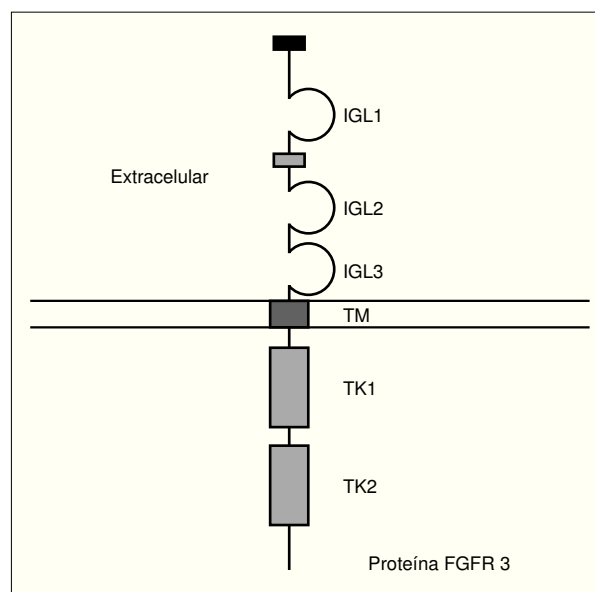


Figura 1. Representación esquemática de la proteína del receptor del factor de crecimiento fibroblástico tipo 3. TK1 y 2: dominios tirosincinasa 1 y 2; TM: dominio transmembrana; IGL1, 2 y 3: dominios inmunoglobulina similares 1, 2 y 3.

TABLA 1. Comparación de las enfermedades genéticas relacionadas con mutaciones en el gen *FGFR3*¹⁸⁻²¹

Enfermedad	Características clínicas principales	OMIM	Tipo de herencia	Dominio proteico (fig. 1)	Mutaciones
Acondroplasia	Enanismo con miembros cortos, macrocefalia, manos en tridente, hiperlordosis lumbar	100800	AD	TM	Gly380Arg, Gly375Cys
Hipocondroplasia	Talla baja, miembros relativamente cortos, macrocefalia relativa	146000	AD	TK1 IGL3	Asn540Lys, Asn540Thr, Asn328Iso, Asn540Ser, Lys650Asn, Lys650Gln, Ile538Val, Lys652Gln
Displasia tanatofórica tipo I	Enanismo letal, craneosinostosis con cráneo en trébol y fémures curvos	187600	AD	TK2 IGL2 IGL3	Ser371Cys, Tyr373Cys, Arg248Cys, Ser249Cys, X807Arg, X807Cys
Displasia tanatofórica tipo II	Enanismo letal, craneosinostosis con cráneo en trébol y fémures curvos	187601	AD	TK2	Lys650Glu
Craneosinostosis coronal de Muenke	Craneosinostosis coronal unilateral o bilateral con alteraciones en carpo y tarso	602849	AD	Unión entre el IFL2 y el IGL3	Pro250Arg
SADDAN	Acondroplasia con fenotipo grave, retraso mental, acantosis <i>nigricans</i> , lesiones óseas graves	134934.0015	AD	TK2	Lys650Met
Displasia letal platispondílica tipo San Diego	Enanismo letal con miembros cortos. Radiológicamente con "espículas" metafisarias	270230	AD?	TK2 IGL2 IGL3	Arg248Cys, Ser249Cys, Tyr373Cys
Craneosinostosis con hiperplasia dérmica (CHE o síndrome simil Beare-Stevenson)	Craneosinostosis prematura de la calota, acantosis <i>nigricans</i> , hiperplasia dérmica, cutis <i>gyrata</i>		AD	Unión entre el IFL2 y el IGL3	Pro250Arg
Crouzon con acantosis <i>nigricans</i>	Craneosinostosis, exoftalmos, hipoplasia mediofacial, acantosis <i>nigricans</i> , cementomas de mandíbula	134934.0011	AD	TM	Ala391Glu

TM: transmembrana; TK1: tirosincinasa 1; TK2: tirosincinasa 2; IGL1: inmunoglobulina similar 1; IGL2: inmunoglobulina similar 2; IGL3: inmunoglobulina similar 3. SADDAN: acondroplasia grave, retraso mental y acantosis *nigricans* (*Severe Acondroplasia, Developmental Delay, Acantosis Nigricans*).

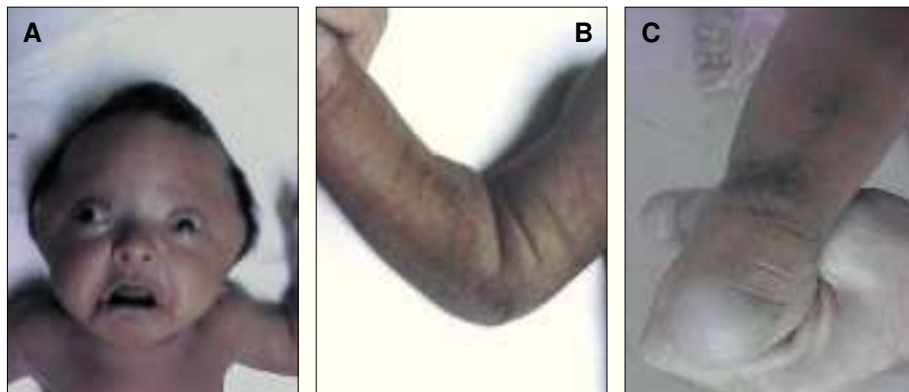


Figura 2. A) *Facies de la paciente. Nótese la craneostenosis con la forma de hoja de trébol. B y C) Brazo y talón de la niña mostrando las zonas de acantosis nigricans.*

transversa, a término. Pesó al nacer 4.300 g. En el período neonatal presentó ictericia que requirió fototerapia y síndrome de aspiración de líquido amniótico meconial, que evolucionó de manera favorable.

La exploración física a los 2 meses de edad presentaba (fig. 2): perímetro cefálico, 37 cm (P₅₀), talla 57,5 cm (P₅₀) y peso de 4.100 g (P₂₅), cráneo en hoja de trébol, occipucio plano, fontanela anterior de 3,5 × 4,5 cm, remolino central posterior, implantación del cabello en la nuca baja. La cara con frente triangular, hendiduras palpebrales horizontales con proptosis ocular, escleróticas azuladas. Nariz de forma picuda, puente nasal ancho, columela triangular, *filtrum* corto, boca con paladar estrecho y plano, frenillo lingual y mentón pequeño. Las orejas estaban implantadas bajas y con rotación posterior, con hélix simplificado, raíz de hélix cruzada, antitrago prominente y lóbulo levantado en la izquierda.

El cuello corto, con acantosis *nigricans*. Abdomen globuloso con hernia umbilical. Las manos presentaban dedos cortos y ahusados, clinodactilia de los quintos dedos, uñas hiperconvexas y estrechas. Pliegues palmares profundos, hiperpigmentados. Pies con pliegues profundos, primer orjejo con uña en cucharita. Piel con hiperpigmentación en área del cuello, tórax, línea alba y cara anterior de los brazos, con áreas de acantosis *nigricans*.

Exámenes complementarios: radiografía de cráneo con conformación en hoja de trébol. Examen ocular y fondo de ojo normal. Cariotipo convencional y bandeado nor-



Figura 3. *TC de la paciente. Obsérvese la braquicefalia, con conformación anormal del cráneo y ventriculomegalia.*

mal (46,XX). Tomografía computarizada (TC) de encéfalo (fig. 3): ventriculomegalia grave a expensas de los ventrículos laterales, con deformación franca de los mismos debido a la craneostenosis.

ESTUDIO MOLECULAR

Se procedió a la extracción de ADN genómico total de leucocitos de sangre periférica de la paciente por los métodos tradicionales de extracción con alcoholes (fenol-cloroformo-isoamílico). Se realizó la purificación y precipitación del ADN con alcohol etílico al 100% y luego se rehidrató en una suspensión de buffer TE (Tris-EDTA). Una alícuota de 250 ng de ADN se utilizó como templado para la amplificación del exón 10 del gen de *FGFR3* por PCR en un volumen final de 50 μ l, usando como *primers* los descritos por Wuchner et al⁸: primer for (20 μ mol): CAGGCCAGGCCTCAACGCC; y primer rev (20 μ mol) AGGCCTGGCGGGCAGGCAGC. Se añadieron a la reacción 40 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de cada uno de los dNTP, Taq polimerasa 0,3 U, y agua hasta completar el volumen de reacción. Se realizó una desnaturalización inicial de 3 min a 95°, seguidos de 30 ciclos de 45 s a 95°, 1 min a 61° y 1 min a 72°, con una extensión final de 7 min a 72°.

La presencia de amplificado se corroboró con la siembra de 10 μ l en un gel de agarosa al 2%. El producto de amplificado fue sometido a digestión enzimática con *Aci I*, sembrados en geles de poliacrilamida 10% y teñidos con tinción de plata. La presencia de un alelo mutado genera un nuevo sitio de restricción, observándose una banda adicional en la corrida electroforética. Para secuenciación, el amplificado se purificó utilizando columnas de purificación Wizard DNA®, y se secuenció en forma automática utilizando un secuenciador automático ABIPrism 310® (Applied Biosystem®).

RESULTADOS

La amplificación del ADN genómico con los oligonucleótidos específicos fue evaluada con un gel de agarosa al 2%, donde se observó la presencia de amplificado con el número de bases esperado.

La digestión con la enzima *Aci I* del amplificado mostró un patrón de 4 bandas correspondiente a lo esperable según el nuevo sitio de restricción generado por la mutación.

La presencia de la transversión fue confirmada por secuenciación directa, observándose heterocigosis en la posición 1172: un nucleótido A (alelo normal) y un nucleótido C (alelo mutado) (fig. 4).

DISCUSIÓN

Hasta la actualidad se han comunicado alrededor de 30 casos de CAN⁹⁻¹¹. Aproximadamente la mitad de estos pacientes han sido estudiados molecularmente, presentando en su totalidad la misma y única transversión (mutación puntual) en el exón 10, la C1172A (Ala391Glu) del gen *FGFR3*.

El síndrome CAN es diferente del SC debido a que: a) la alteración molecular reside en genes diferentes; b) la mutación en el síndrome CAN es altamente conservativa y homogénea (todos los pacientes comunicados hasta el momento presentan la mutación Ala391Glu), y c) el CAN puede presentar hallazgos clínicos (acantosis nigricans) y radiológicos (alteraciones en las distancias interpedunculares vertebrales y cementomas de mandíbula) no observables en el SC.

La mutación Ala391Glu fue confirmada por secuenciación directa del fragmento génico. Dicha mutación en CAN está en el dominio transmembrana de la proteína de *FGFR3*, distante a sólo 11 aminoácidos de la mutación Gly380Arg que se observa en más del 95% de los pacientes con acondroplasia. Este hecho es interesante, debido a que el fenotipo del CAN es totalmente diferente al de la acondroplasia, aun compartiendo alteraciones en el mismo gen y en el mismo dominio proteico transmembrana (tabla 1).

No obstante, existe cierto grado de superposición de los signos clínicos entre las diferentes patologías asociadas con las mutaciones del *FGFR3*. Por ejemplo, la falta de progresión en las distancias interpedunculares de las vértebras lumbares en el CAN es muy similar a la que se observa en la acondroplasia e hipocondroplasia. Otros hallazgos radiológicos sutiles que remedan a la acondroplasia e hipocondroplasia tales como estrechamiento del foramen magno, cuerpos vertebrales pequeños, falanges y metacarpianos cortos y anchos, cuellos femorales acortados, estrechamiento de las hendiduras sacrociáticas y raíces acetabulares achatadas, también se hallaron en varios pacientes con CAN⁹.

Otros síndromes como el síndrome de Muenke, la acondroplasia homocigota, las displasias tanatofóricas y el recientemente descrito síndrome de craneosinostosis con hiperplasia dérmica (CHE o síndrome Beare-Steven-son símil)¹² presentan craneosinostosis al igual que el CAN; más aún, existe una comunicación aislada de craneosinostosis con cráneo en trébol, en un paciente con hipocondroplasia molecularmente confirmado¹³.

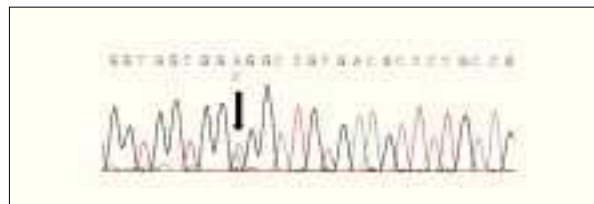


Figura 4. Fragmento de amplificado del exón 10 (secuenciación automática) del *FGFR3*. Nótese la heterocigosis (flecha) donde se observa un alelo con A y otro con C, correspondiente a la posición 1172 de la secuencia nucleotídica del gen.

Respecto a la acantosis nigricans se observa no sólo en el CAN, sino clásicamente en la acondroplasia grave con retardo madurativo y acantosis nigricans (SADDAN) (tabla 1), en el CHE y en algunas publicaciones aisladas de displasia tanatofórica tipo I¹⁴. De esta forma, la correlación fenotipo-genotipo no es total en las enfermedades asociadas al *FGFR3*, y evidencias recientes sugieren que las diferencias fenotípicas pueden deberse a alelos específicos con varios grados de activación ligando-independiente, llevando al receptor *FGFR3* a una activación constitutiva continua¹⁵.

Nuestro paciente presenta las típicas características fenotípicas del CAN: facies del síndrome de Crouzon, craneosinostosis con cráneo en trébol, hidrocefalia y acantosis nigricans. Meyers et al⁶ enfatizan que 3 de sus 4 pacientes con CAN desarrollaron hidrocefalia requiriendo derivaciones ventriculoperitoneales para descomprimir. Algunos de estos pacientes también presentaban atresia de coanas. La observación de atresia de coanas y/o hidrocefalia puede ser un signo clínico precoz de sospecha de CAN, ya que estas alteraciones se observan infrecuentemente en el SC clásico.

Entre los casos comunicados de CAN parecería haber un exceso de pacientes de sexo femenino. Esto también ha sido observado en otros síndromes como en el SADDAN^{6,16,17}.

Si bien Cohen⁷ propone llamar a esta enfermedad *Crouzonodermoskeletal syndrome*, creemos preferible denominarlo CAN, ya que designa mejor esta entidad clínica que es pasible de diagnóstico molecular distinguible del SC. Estas diferencias son relevantes para un correcto diagnóstico clínico y prenatal de la patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crouzon O. Dysostose cranio-faciale hereditaire. Bull Mem Soc Med Hop Paris 1912; 33: 545-555.
2. Reddy BS, Garg BR, Padiyar NV, Krishnam AS. An unusual association of acanthosis nigricans and Crouzon's disease - a case report. J Dermatol 1985; 12: 85-90.
3. Suslak L, Glista B, Gertzman GB, Lieberman L, Schwartz RA, Desposito F. Crouzon syndrome with periapical cemental dysplasia and acanthosis nigricans: the pleiotropic effect of a single gene? Birth Defects Orig Artic Ser 1985; 21: 127-134.

4. Breitbart AS, Eaton C, McCarthy JG. Crouzon's syndrome associated with acanthosis nigricans: Ramifications for the craniofacial surgeon. *Ann Plastic Surg* 1989; 22: 310-315.
5. Koizumi H, Tomoyori T, Sato KC, Ohkawara A. An association of acanthosis nigricans and Crouzon syndrome. *J Dermatol* 1992; 19: 122-126.
6. Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nature Genet* 1995; 11: 462-464.
7. Cohen MM Jr. Let's call it "Crouzonodermoskeletal syndrome" so we won't be prisoners of our own conventional terminology [cartal]. *Am J Med Genet* 1999; 84: 74.
8. Wuchner C, Hilbert K, Zabel B, Winterpacht A. Human fibroblast growth factor receptor gene (FGFR3): Genomic sequence and primer set information for gene analysis. *Hum Genet* 1997; 100: 215-219.
9. Schweitzer DN, Graham JM Jr, Lachman RS, Jabs EW, Okajima K, Przylepa KA et al. Subtle radiographic findings of achondroplasia in patients with Crouzon syndrome with acanthosis nigricans due to an ala391-to-glu substitution in FGFR3. *Am J Med Genet* 2001; 98: 75-91.
10. Nagase T, Nagase M, Hirose S, Ohmori K. Crouzon syndrome with acanthosis nigricans: Case report an mutational analysis. *Cleft Palate Craniofac J* 2000; 37: 78-82.
11. Robson CD, Mulliken JB, Robertson RL, Proctor MR, Steinberger PD, McFarren A et al. Prominent basal emissary foramina in syndromic craniosynostosis: Correlation with phenotypic and molecular diagnosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1707-1717.
12. Roscioli T, Flanagan S, Mortimore RJ, Kumar P, Weedon D, Masel J et al. Premature calvarial synostosis and epidermal hyperplasia (Beare-Stevenson syndrome-like anomalies) resulting from a P250R missense mutation in the gene encoding fibroblast growth factor receptor 3. *Am J Med Genet* 2001; 101: 187-194.
13. Angle B, Hersh JH, Christensen KM. Molecularly proven hypochondroplasia with cloverleaf skull deformity. A novel association. *Clin Genet* 1998; 54: 417-420.
14. Baker KM, Olson DS, Harding CO, Pauli RM. Long term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *Am J Med Genet* 1997; 70: 427-436.
15. 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.
16. Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McInosh I et al. A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the FGFR3 gene. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 722-731.
17. Wilkes D, Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Moss C, Ellis JP et al. A recurrent mutation, ala391glu, in the transmembrane region of FGFR3 causes Crouzon syndrome and acanthosis nigricans. *J Med Genet* 1996; 33: 744-748.
18. Bellus GA, Bamshad MJ, Przylepa KA, Dorst J, Lee RR, Hurko, Jabs EW et al. Severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans (SADDAN): Phenotypic analysis of a new skeletal dysplasia caused by a Lys650Met mutation in the FGFR3. *Am J Med Genet* 1999; 85: 53-65.
19. Brodie SG, Kitoh H, Lachman RS, Nolasco LM, Mekikian PB, Wilcox WR. Platypondylic lethal skeletal dysplasia, San Diego Type is caused by FGFR3 mutations. *Am J Med Genet* 1999; 84: 476-480.
20. Orlow SJ. Cutaneous findings in craniofacial malformation syndromes. *Arch Derm* 1992; 128: 1379-1386.
21. Proudman TW, Moore MH, Abbott AH, David DJ. Noncraniofacial manifestations of Crouzon's disease. *J Craniofac Surg* 1994; 4: 218-222.