



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ESPECIALIDAD EN:
GENÉTICA MÉDICA

ESTUDIO CÍNICO Y MOLECULAR DE UN GRUPO DE
PACIENTES CON CONDROMATOSIS

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DR. DIEGO LEÓN ZARAGOZA

PROFESOR TITULAR
DRA. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES

ASESORES: Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES

Dr. en C. EDITH FALCÓN RAMÍREZ

Dr. en C. VALERIA PONCE DE LEÓN SUÁREZ



MEXICO, D.F.

FEBRERO DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. MATILDE L. ENRÍQUEZ SANDOVAL

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ

SUBDIRECTORA DE POSTGRADO Y EDUCACION CONTINUA

DR. LUIS GÓMEZ VELÁZQUEZ

JEFE DE LA DIVISION DE ENSEÑANZA MÉDICA

Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES

PROFESOR TITULAR

Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES

ASESOR CLINICO

Dr. en C. EDITH FALCÓN RAMÍREZ

ASESOR METODOLÓGICO

Dr. en C. VALERIA PONCE DE LEÓN SUÁREZ

ASESOR METODOLÓGICO

INDICE

	Pág.
I.- RESUMEN.....	7
II.- ANTECEDENTES.....	8
III.- JUSTIFICACIÓN.....	30
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
V.- OBJETIVO	31
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
VII.- PROCEDIMIENTO.....	31
VIII.- RESULTADOS.....	40
IX.- DISCUSIÓN.....	60
X.- CONCLUSIONES.....	63
XI.- ANEXOS.....	64
XII.- BIBLIOGRAFIA.....	67

DEDICATORIA

A MIS PADRES

POR EL EJEMPLO Y EL ESFUERZO QUE HAN HECHO POR NOSOTROS.
GRACIAS POR TODO MAMÁ Y PAPÁ.

A MIS HERMANOS

POR SU APOYO Y PORQUE HAN DEMOSTRADO SER UN MODELO A
SEGUIR. GRACIAS POR ESTAR CONMIGO.

A LUCÍA

POR SU COMPRENSIÓN, MOTIVACIÓN Y FUERZA PARA SALIR
ADELANTE. GRACIAS POR TU PRESENCIA FLACA, T.Q.M.

A MIS SOBRINOS Y A SUS PAPÁS

POR EL CARIÑO Y APOYO RECIBIDO. PORQUE SE QUE PUEDO CONTAR
CON USTEDES.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PROFESORES:

Dra. Margarita Valdés Flores

Dr. Norberto Leyva García

Dr. Antonio Miranda Duarte

Dra. Ma. de la Luz Arenas Sordo

Por su esfuerzo y por ayudarme en mi formación como médico especialista.

A MIS ASESORES:

Dra. Edith Falcón Ramírez y

Dra. Valeria Ponce de León Suárez

Por su paciencia y apoyo, ya que sin ustedes no habría podido concluir este trabajo.

A los médicos del Servicio de Tumores Óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación: Dr. Luis Miguel Linares González y Dr. Ernesto Delgado Cedillo.

A la Dra. Leonora Casas Ávila.

A MIS COMPAÑEROS

Gracias por su amistad y por su presencia.

RESUMEN

La Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria (OMH) es la causa más frecuente de tumores óseos benignos, con una prevalencia calculada de 1 en 50,000, sin embargo, la prevalencia en población mexicana es desconocida. Esta enfermedad presenta un patrón de herencia mendeliano (autosómico dominante), con una penetrancia de casi el 100% y expresividad variable. Hasta el momento se conocen 2 genes cuyas mutaciones están relacionadas con la enfermedad: EXT1 y EXT2, mapeadas en 8q24 y 11p11-p12, respectivamente.

Objetivo: analizar los exones 1, 2 y 9 del gen EXT1 en un grupo de pacientes mexicanos con Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria, en la búsqueda de mutaciones en estos *hot spots* mutacionales previamente reportados.

Materiales y Métodos: se estudiaron 14 pacientes, 6 del sexo masculino y 8 del sexo femenino, por medio de un cuestionario para recabar los datos clínicos más significativos de la enfermedad; así mismo, se solicitaron radiografías de huesos largos, para corroborar la localización anatómica y características de los osteocondromas. Además, se realizó el análisis molecular de los exones 1, 2 y 9 del gen EXT1, por medio de la técnica de secuenciación, para búsqueda de mutaciones en su secuencia.

Resultados: en nuestra serie de pacientes analizados, son una constante los hallazgos de asociación familiar, presencia de dolor, deformidad y la necesidad de múltiples intervenciones quirúrgicas para resección de osteocondromas. Con respecto a la localización anatómica de los osteocondromas, encontramos hallazgos que corresponde a lo reportado en la literatura médica; sin embargo, la talla baja no es hallazgo clínico frecuente en nuestra serie de pacientes. En el estudio molecular encontramos un cambio de nucleótidos en el exón 9 (T por G), que determina una substitución de aminoácidos (E587D).

Conclusiones: la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria es una enfermedad con una marcada expresividad variable entre miembros de una misma familia. El hallazgo molecular reportado podría corresponder a una mutación o a un polimorfismo frecuente en población mexicana. Este es el primer estudio que se realiza en población mexicana para búsqueda de mutaciones en EXT1, sin embargo, es necesario realizar más investigación con el objetivo de establecer el genotipo en nuestra población y de tal modo poder establecer una correlación genotipo-fenotipo.

ANTECEDENTES

La Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria (OMH), antes llamada Exostosis Múltiple Hereditaria, se caracteriza por la presencia de múltiples osteocondromas (tumores óseos benignos cubiertos de cartílago), se localizan predominantemente en las metáfisis de los huesos largos, lo que puede condicionar la presencia de dolor, deformidades óseas y talla baja. En los casos severos ocurre degeneración maligna y decremento en la calidad de vida debido a las múltiples intervenciones quirúrgicas que se requieren para resección de los osteocondromas. Esta enfermedad presenta un patrón de herencia mendeliano (autosómico dominante), con una penetrancia elevada, de más del 95%. Su prevalencia es de 1 en 50,000 individuos dentro de la población general (Schmale et al 1994) y parece ser más frecuente en varones (relación hombre-mujer 1.5:1). Esto podría deberse a que los varones suelen presentar un fenotipo más severo y son diagnosticados con mayor frecuencia (Legeai-Mallet et al 1997). Sin embargo, hay poblaciones con prevalencias tan altas como 1 en 100 (reportada en una población pequeña de Guam) (Krooth et al 1961). La forma solitaria (esporádica) de osteocondroma es aproximadamente seis veces más común que la forma múltiple de osteocondromatosis. Aproximadamente, 62% de los pacientes con osteocondromas múltiples tienen una historia familia positiva de la enfermedad.

Clínicamente la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria se caracteriza por la presencia de 2 o más osteocondromas en huesos largos, los cuales aparecen principalmente en la primera década de la vida, disminuyendo el crecimiento cuando las placas de crecimiento se cierran en la pubertad. Son de dos tipos: sésiles o pediculados, dependiendo si son de base amplia o no. El número de

osteochondromas puede variar significativamente dentro y entre familias. Se pueden encontrar una serie de complicaciones ortopédicas como: deformidad de antebrazo (figuras 2 y 3), desigualdad en la longitud de miembros, angulación en varo o valgo de rodilla y riesgo de fracturas. Se han identificado 2 genes, cuyas mutaciones están relacionadas con la enfermedad: EXT1 y EXT2, mapeados en 8q24 y 11p11-p12 respectivamente. Ambos genes codifican para glucosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de heparán sulfato (HS), pero hasta el momento no se conoce por completo el mecanismo fisiopatogénico de la enfermedad.

Historia natural de la enfermedad

Al nacimiento aproximadamente un 5% de los individuos con la mutación presentan osteochondromas, el cual aumenta a 96% a la edad de 12 años (Legeai-Mallet et al 1997). La edad promedio del diagnóstico son los 3 años. Desde el punto de vista morfológico, los osteochondromas se comportan de manera similar a la placa de crecimiento epifisiaria (Hammetman et al 2006), en donde se pueden distinguir diferentes zonas de osificación endocondral.

Tal y como ocurre en las placas de crecimiento, los osteochondromas dejan de crecer después de la pubertad, por lo que estas lesiones aumentan en número y tamaño durante el desarrollo esquelético y dejan de crecer con la madurez esquelética. Sin embargo, es posible que se desarrollen nuevas exostosis en la edad adulta. Se calcula que para la vida adulta, el 75% de los individuos afectados tendrá alguna deformidad ósea (figura 1). Se ha observado que los

varones tienden a presentar un fenotipo más severo que las mujeres, sin que se conozca con exactitud la causa de este fenómeno.

Los sitios anatómicos en donde se presentan los osteocondromas con mayor frecuencia son: escápulas, húmeros, antebrazos, tobillos y rodillas, siendo éste último uno de sitios anatómicos donde se encuentran con mayor frecuencia osteocondromas (70%), por lo que en caso de sospecha diagnóstica se solicitan radiografías de rodillas (figuras 1 y 2).

Por otro lado, se ha reportado que 40% de los individuos con osteocondromatosis múltiple presentan talla baja, aunque en algunos casos se puede deber a interferencia con el crecimiento lineal de los huesos largos de la piernas, que resulta en una disminución de la talla final en la edad adulta (Porter et al 2004).



Figura 1. Paciente con OMH en rodillas y tobillos, que da lugar a deformidad en miembros inferiores.



Figura 2. Imágenes radiográficas que muestran osteocondromas alrededor de la rodilla, pelvis y fémur proximal. La radiografía de la extremidad derecha muestra deformidad del antebrazo (acortamiento de la ulna con encorvamiento secundario del radio).

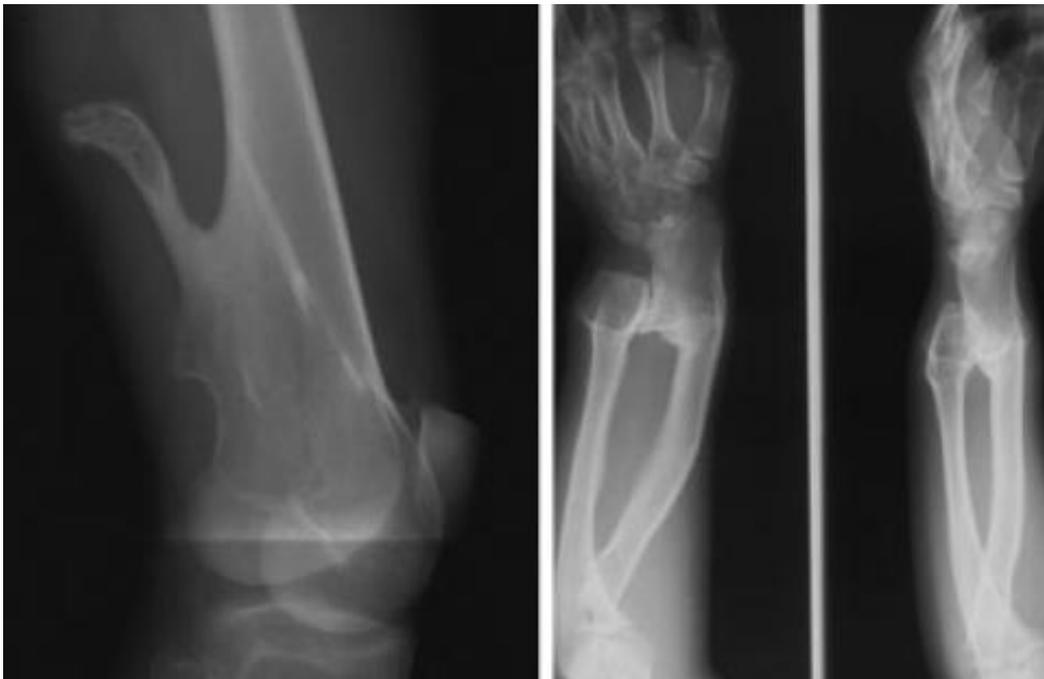


Figura 3. Imagen izquierda: radiografía que muestra osteocondroma en el fémur. Imagen derecha: encorvamiento del radio con acortamiento de ulna, que condiciona deformidad del antebrazo.

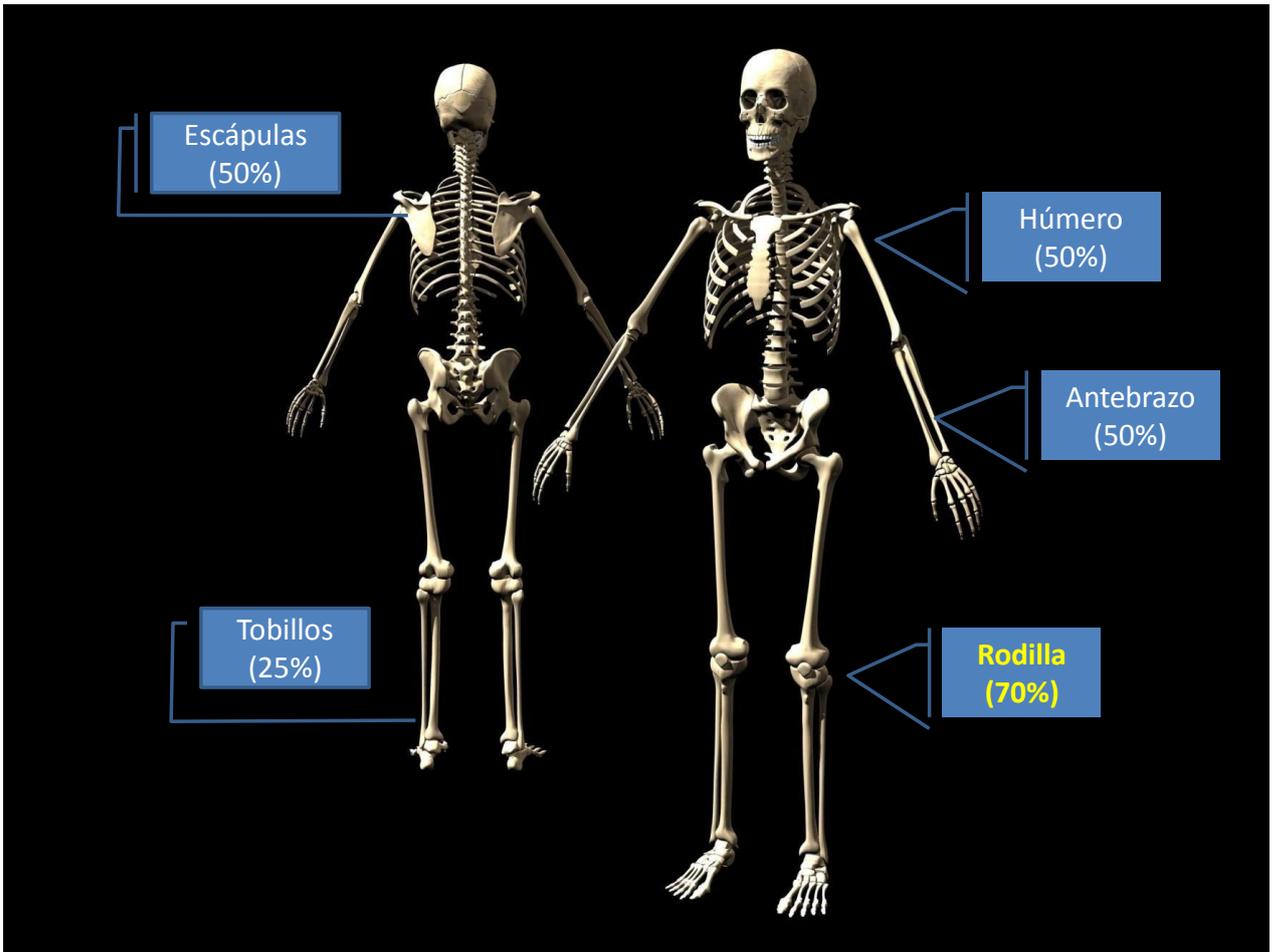


Figura 4. Sitios anatómicos en donde se presentan con mayor frecuencia los osteocondromas en la OMH.

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza con base en los hallazgos radiográficos de múltiples exostosis (la característica radiográfica clave para distinguirlo de los encondromas, es la presencia de un flujo ininterrumpido del hueso cortical y medular del hospedero dentro del osteocondroma), los antecedentes familiares del paciente, consistentes con un patrón de herencia autosómico dominante y datos histológicos propios del osteocondroma. También se puede realizar el diagnóstico molecular, buscando mutaciones puntuales o deleciones en los genes EXT1 y EXT2.

En caso de sospecha de malignidad, se debe realizar resonancia magnética (RM) o tomografía axial computarizada (TAC) para evaluar el tamaño del capuchón cartilaginoso, teniendo precaución cuando éste presenta más de 1.5 cm de grosor. También podemos apoyarnos de técnicas como PET y estudios de medicina nuclear.

Diagnósticos diferenciales

Hace algunos años los osteocondromas se conocían como exostosis, sin embargo, actualmente se recomienda utilizar el término osteocondroma, ya que éste hace referencia a un crecimiento cartilaginoso que osifica, y no simplemente a un crecimiento de hueso. El diagnóstico diferencial de la OMH es amplio, abarcando síndromes de microdelección, la presencia de un osteocondroma aislado y enfermedades que cursan con encondromas; sin embargo, cada una de estas condiciones tiene características clínicas y radiológicas particulares que permiten realizar el diagnóstico diferencial con la

OMH. Es importante descartar alguna otra condición clínica que semeja a la OHM, por lo que a continuación se describen las características clínicas de los diagnósticos diferenciales.

Osteocondroma solitario. Presente en el 1-2% de la población, caracterizado por la presencia de un osteocondroma aislado benigno y con características radiológicas similares a OMH.

Metacondromatosis. Condición con patrón de herencia autosómico dominante, caracterizado por la presencia de osteocondromas y encondromas (radiológicamente distinguible del osteocondroma). En la metacondromatosis los osteocondromas se localizan principalmente en los dedos y no provoca deformidad de huesos largos.

Síndrome Langer-Giedon (síndrome trico-rino-falángico). Este es un desorden genómico caracterizado por microdelección de los genes EXT1 y TRPS1 en 8q24.11. Clínicamente se caracteriza por exostosis múltiple, retraso mental, cabello delgado, nariz bulbosa y alteraciones en falanges.

Síndrome Potocki-Shaffer. Es un síndrome de microdelección 11p11, que involucra delección del gen ALX4 y clínicamente se manifiesta por defectos de osificación del cráneo.

Encondromatosis (enfermedad de Ollier y síndrome de Maffucci). Con características radiológicas distinguibles de un osteocondroma. La mayoría de los casos son esporádicos, aunque se ha reportado un patrón de recurrencia compatible con herencia autosómica dominante.

Complicaciones

Los osteocondromas se pueden asociar a con una reducción en el crecimiento esquelético de los huesos largos, deformidad ósea, restricción en la movilidad articular, osteoartrosis prematura, talla baja y compresión de nervios periféricos.

Una de las complicaciones más importantes a considerar en pacientes con OMH, es la degeneración maligna a condrosarcoma, con incidencias de 0.5 al 20%; esta degeneración maligna aumenta con la edad.

Tratamiento

El tratamiento es sobre todo ortopédico e incluye sobre todo la resección de los osteocondromas. Esto se recomienda cuando los osteocondromas ocasionan dolor intenso, compresión nerviosa, deformidad de antebrazo, o bien, por cuestiones estéticas muy particulares. Se recomienda mantener una estrecha vigilancia del tamaño de los osteocondromas sobre todo en la edad adulta, esto con el fin de identificar tempranamente la degeneración maligna.

Aspectos genéticos

La Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria tiene un patrón de herencia autosómico dominante, con una penetrancia de aproximadamente 96%. Algunos autores calculan que diez por ciento de los casos de OMH se deben a mutaciones de novo (Schmale et al 2008).

Se conocen 2 genes asociados con OMH:

- EXT1
- EXT2

Sin embargo, se ha sugerido un tercer gen, EXT3, mapeado en el cromosoma 19 (Le Merrer et al 1994), no obstante esto no se ha comprobado aún. Por otro lado, hay estudios que descartan mutaciones en los 3 loci descritos (cromosomas 8, 9 y 19), lo que sugiere otros loci para OMH aún no identificados (Hecht et al 1995). Se ha reportado que las mutaciones en EXT1 (aproximadamente 56% - 78% de los casos de OMH) son más frecuentes que en EXT2 (aproximadamente 21% - 44% de los casos), sin embargo, hay que considerar que esto puede variar de acuerdo a la población y grupo étnico estudiado, Cabe señalar que la mayoría de los estudios se han encaminado a la identificación de mutaciones en EXT1.

EXT1 y EXT2 pertenecen a una gran familia de genes homólogos, la familia EXT de genes tumor supresor. Se han clonado genes homólogos adicionales como los EXT-like (EXTL1, EXTL2 y EXTL3). En humanos, las proteínas EXT, exostosina 1 y exostosina 2 son glucoproteínas de 746 y 718 aminoácidos, respectivamente. EXT1 y EXT2 tienen una estructura glucoprotéica transmembranal tipo II y ambas proteínas se localizan predominantemente en el retículo endoplásmico. Dichas proteínas poseen actividad N-acetilglucosamina (GlcNac) y ácido D-glucurónico (GlcA) transferasa (T), representativas de una HS-polimerasa (HS-pol). Se piensa que EXTL2 inicia la formación de la cadena de HS transfiriendo el primer residuo GlcNac a una secuencia ligada a un tetrasacárido específico en la proteína central de

proteoglucanos de HS, proporcionando así el sustrato para la polimerización por EXT1 y EXT2. Estudios indican que EXT1 y EXT2 forman un complejo heterooligomérico *in vivo*, lo que da lugar a la acumulación de ambas proteínas en el aparato de Golgi (Kobayashi et al 2000; McCormick et al 2000). El complejo EXT1 / EXT2 localizado en Golgi posee substancialmente mayor actividad glucosiltransferasa que EXT1 aislado, sugiriendo que este complejo representa la forma biológicamente relevante de la enzima HS-polimerasa (McCormick et al 2000). Estos hallazgos han sido confirmados en levaduras (Senay et al 2000).

Este modelo heterooligomérico en la síntesis de HS explica porqué mutaciones en cualquiera de estos 2 genes resulta en la presencia de Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria (McCormick et al 2000).

Modelos *in vivo* han demostrado la importancia de HS para un adecuado crecimiento y desarrollo del cartílago. Por otra parte, se ha confirmado la relación entre EXT y Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria, quedando claro que la expresión de exostosina es significativamente menor en condrocitos derivados de OMH (Bernard et al 2001).

La mayoría de las mutaciones en EXT1 y EXT2 resultan en una proteína trunca y en pocos casos las mutaciones afectan residuos de aminoácidos principalmente en el extremo N terminal de las proteínas EXT1 y EXT2 (Wuyts and Van Hul 2000).

Se ha reportado que los residuos de aspartato son componentes importantes de sitios catalíticos para actividad glucosiltransferasa (Busch et al 1998), lo cual posteriormente fue corroborado por Cheung y colaboradores (2001).

Confirmando que EXT1 requiere un residuo aspartato (D) en la posición 164 para una función HS-polimerasa.

Gen EXT1

El gen EXT1, se localiza en 8q24.1 y consta de 11 exones (figura 5). La región codificante está compuesta de 3.4-kb de cDNA y codifica para una proteína de 746 aminoácidos (figura 7) con un peso molecular de 86.3 kD. El producto de EXT1, la proteína exostosina 1, se expresa en varios tejidos.

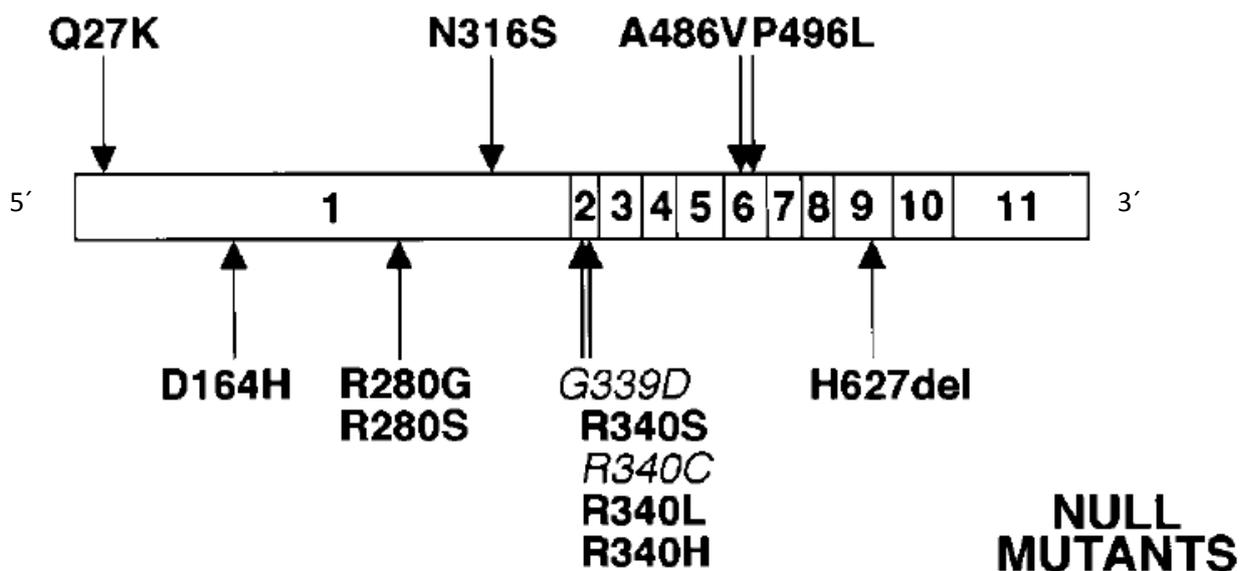


Figura 5. Representación esquemática de la región codificante de EXT1, ilustrando los 11 exones del gen EXT1. Se ilustran algunas de las mutaciones de sentido equivocado reportadas; en la parte de abajo se muestran las mutaciones *null*, que impiden la biosíntesis de HS y en la parte de arriba las mutaciones *activas*, que se ha comprobado permiten la síntesis de HS (Cheung et al 2001).

Gen EXT2

El gen EXT2 se localiza en 11p12-p11 y consta de 14 exones. Codifica para una proteína de 718 aminoácidos, con un peso molecular de 82 kD. EXT2 presenta una gran homología con el producto de EXT1 y tiene un mRNA de 3.5-kb (figura 6).

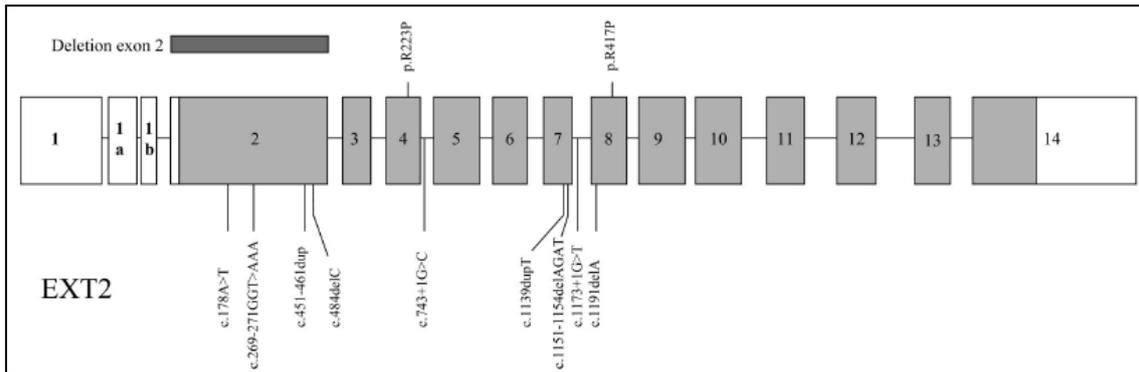


Figura 6. Representación esquemática de la región codificante de EXT2, ilustrando los 14 exones del gen EXT2. Se muestra la distribución de algunas mutaciones detectadas (Jennes et al 2008).

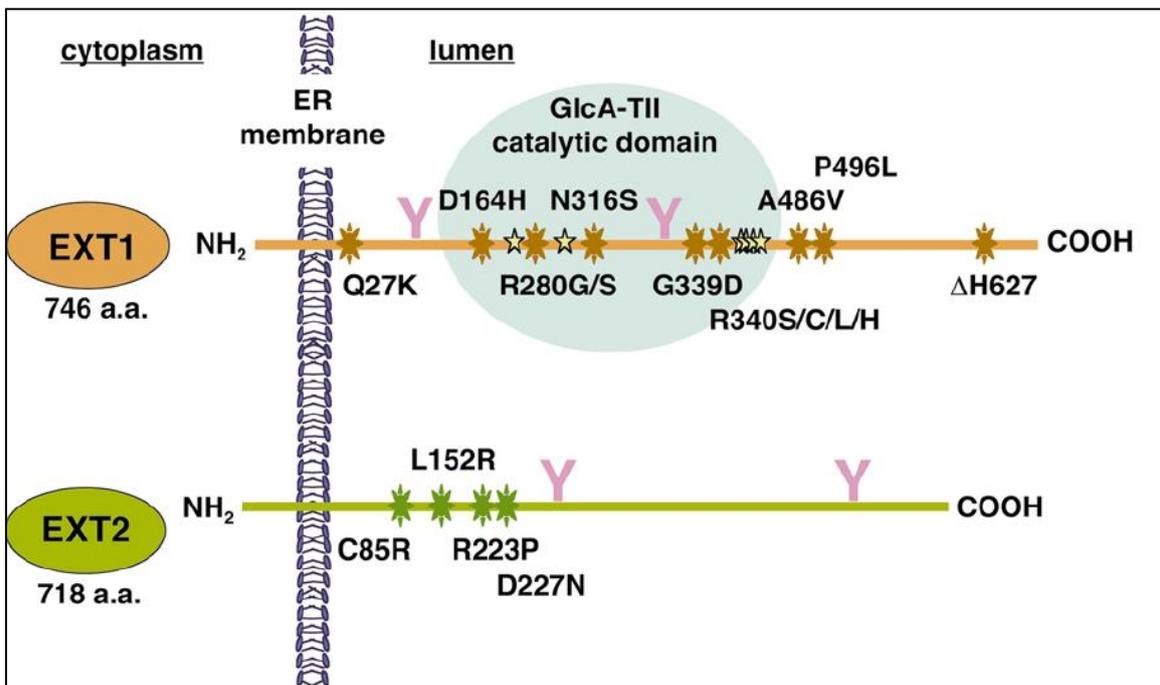


Figura 7. Representación esquemática de las proteínas EXT1 y EXT2 (Duncan 2001).

La expresión anómala de los genes EXT en la OMH y en los condrosarcomas por mutaciones, probablemente altera la síntesis de proteoglicanos de heparán sulfato, y en consecuencia afecta la vía de señalización IHH/PTHLH/FGF.

Mutaciones en los genes tumor supresor EXT1 y EXT2 resultan en un complejo EXT1/EXT2 disfuncional que se cree altera la biosíntesis de heparán sulfato en la placa de crecimiento, dando lugar a la formación de un osteocondroma (Hameetman et al 2007). Esto puede dar lugar a un inadecuado transporte de proteoglicanos de heparán sulfato a la superficie celular, resultando en el acúmulo intracelular en el aparato de Golgi (figura 8).

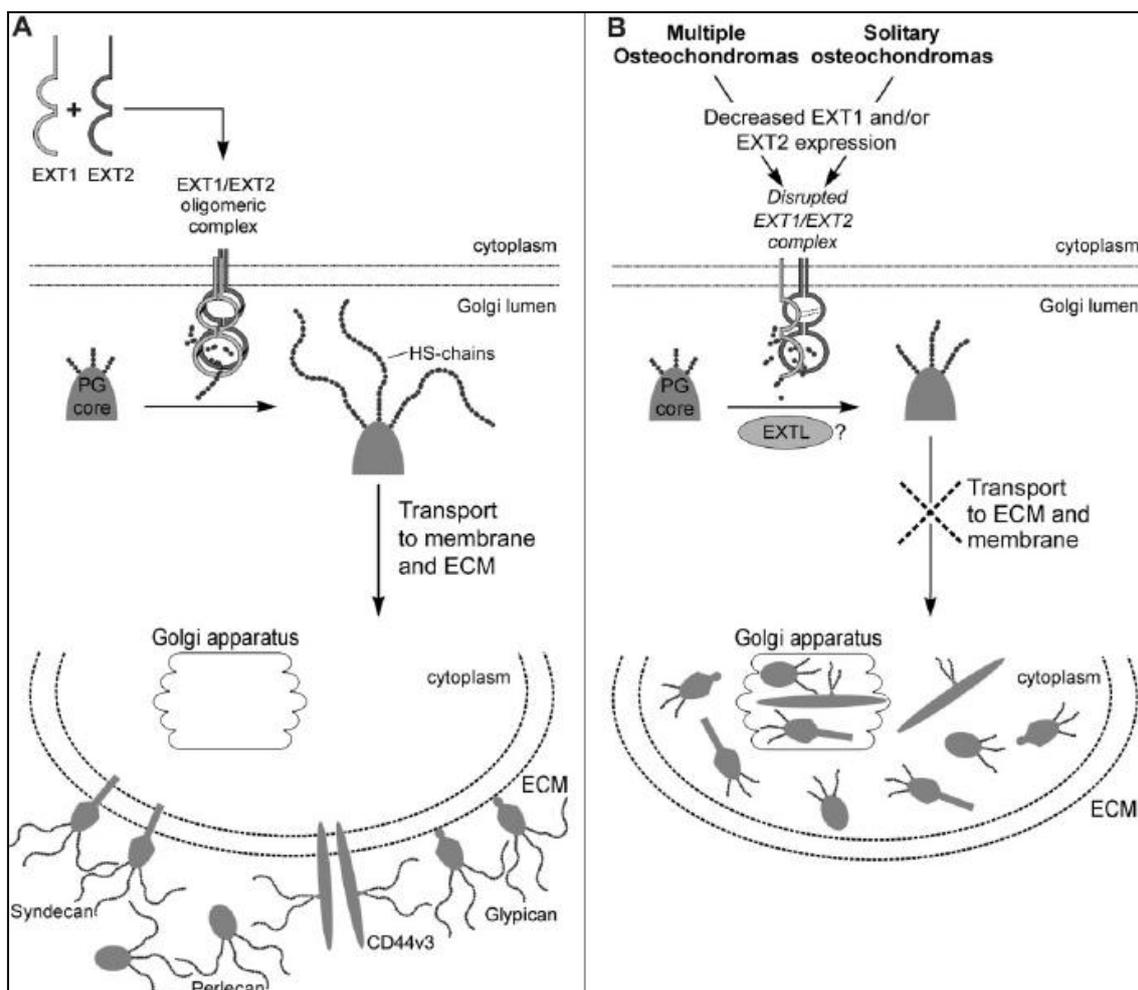


Figura 8. Tomado de Hameetman 2007. Representación esquemática de la función

del complejo EXT1/EXT2 en un tejido normal (A) y en tumores (B). (A) en tejido normal, EXT1 y EXT2 forman un complejo hetero-oligomérico involucrado en la biosíntesis de heparán sulfato (HS) en el aparato de Golgi. El complejo EXT1/EXT2 polimeriza disacáridos de HS sobre proteínas centrales de proteoglicanos para formar proteoglicanos de HS (HSPGs). Los HSPGs son posteriormente transportados a la membrana celular o a la matriz extracelular (ECM). (B) Modelo hipotético de biosíntesis aberrante de HS en osteocondromas y condrosarcomas. Se ha demostrado expresión disminuida de EXT1 y/o EXT2 en tumores hereditarios y solitarios ((Hameetman et al 2007). Un complejo protéico EXT1/EXT2 aberrante probablemente no será capaz de polimerizar completamente disacáridos de HS. Los genes EXTL pueden ser capaces de polimerizar cadenas más cortas. Algunos estudios (Hameetman et al 2007) han sugerido que los HSPGs anormales no son adecuadamente transportados a la membrana celular y a la matriz extracelular y son retenidos en el aparato de Golgi y en el citoplasma de la célula.

Señalización Hedgehog

Los proteoglicanos de heparán sulfato son muy importantes para establecer una adecuada señalización en la placa de crecimiento (figura 9), de tal forma que los genes EXT y las cadenas de heparán sulfato intervienen en la difusión de IHH (Indian Hedgehog), el cual es parte de una cascada de señalización que ocurre en la placa de crecimiento. Las moléculas de señalización de IHH se expresan en los osteocondromas, pero su expresión disminuye durante la progresión maligna a condrosarcoma. La vía de señalización Hedgehog juega un rol importante durante el desarrollo embrionario y postembriónico, en donde este gen participa en la proliferación y diferenciación celular. Si las proteínas EXT son defectuosas o bien están ausentes, la expresión de los proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular puede ser alterada o ausente, afectando la difusión de IHH a su receptor. En la placa de crecimiento, Indian Hedgehog regula la proliferación y diferenciación de condrocitos, junto

con la hormona semejante a la hormona paratiroidea (PTHrH). En pacientes con OMH se han detectado alteraciones en la vía de señalización IHH.

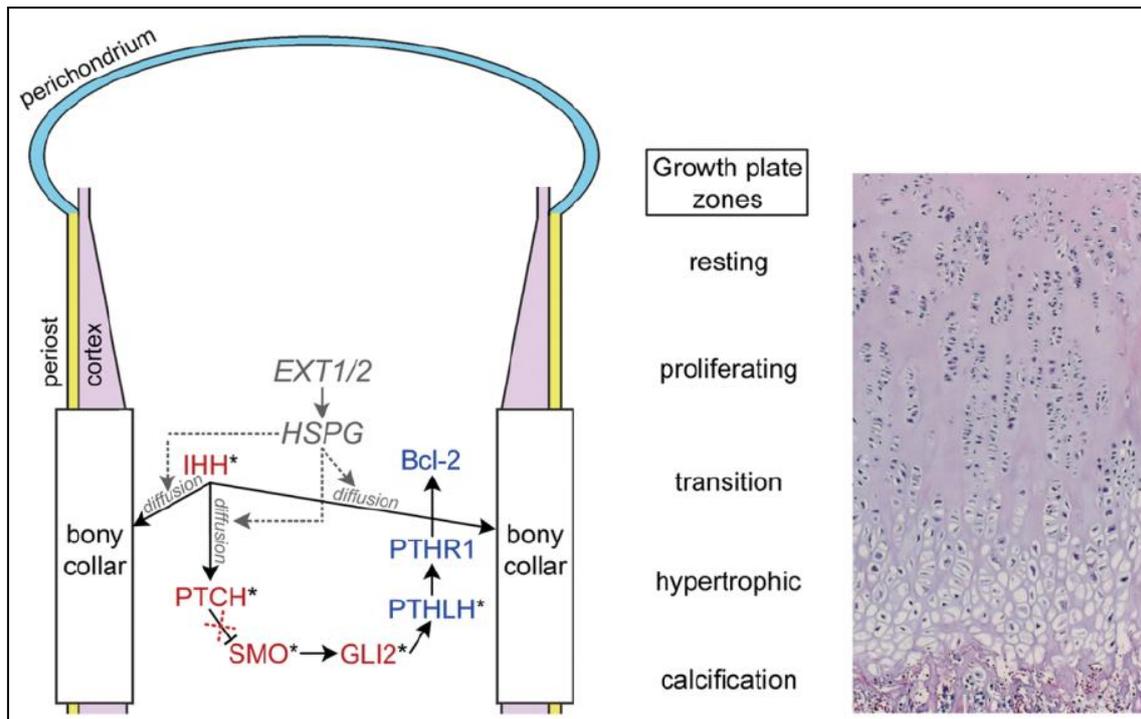


Figura 9. Tomado de Hameetman 2006. Señalización IHH/PTHrH en la placa de crecimiento postnatal. En la zona de transición IHH se une a PTCH, liberando su efecto inhibitorio sobre Smoothed (SMO). Entonces SMO activa el factor de transcripción GLI2, que subsecuentemente se mueve al núcleo para comenzar la transcripción de genes blanco de IHH. Uno de estos blancos es PTHrH (hormona semejante ala hormona paratiroidea). Después PTHrH se une a su receptor PTHR1, Bcl-2 es sobre expresado, inhibiendo la diferenciación de condrocitos. Si las proteínas EXT son defectuosas o están ausentes, la expresión de proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular puede ser alterada o estar ausente, afectando la difusión de IHH a su receptor (Hameetman et al 2006).

En conclusión, se ha demostrado que en la osteocondromatosis hereditaria la inactivación mutacional de EXT1 o de EXT2 da lugar a la pérdida de la expresión de mRNA del gen correspondiente (Hameetman et al 2007). Se cree que esta pérdida de expresión de EXT interrumpirá la función del complejo EXT1/2 en la biosíntesis de proteoglicanos de heparán sulfato, dando lugar a la acumulación intracelular de proteínas nucleares de proteoglicanos de heparán sulfato que se encuentran en estos tumores.

Progresión a malignidad

La vía de señalización Indian Hedgehog (IHH) interviene en procesos de tumorigénesis, así como en el proceso de osificación endocondral, lo que sugiere su participación en el desarrollo de osteocondromas y el desarrollo de condrosarcomas. Algunos investigadores (Bovée et al 2000 y Hameetman 2005) han demostrado que moléculas corriente abajo en las vías de señalización IHH/PTH1H no se expresan en osteocondromas, lo que sugiere que la señalización de crecimiento está alterada. Por otro lado, la transformación maligna da lugar a re-expresión de estas moléculas de señalización. A pesar de la inactivación de la vía de señalización IHH, existe una señalización PTH1H (parathyroid hormone-like hormone) independiente de IHH activa en los condrosarcomas, y un candidato para activar la señalización PTH1H en ausencia de IHH, es el gen TGF-beta (transforming growth factor- β), el cual puede regular la expresión de PTH1H, por lo que se propone que la vía de señalización TGF-beta es activada en condrosarcomas con alto grado de malignidad (Hameetman et al 2006), por lo que es posible que en condrosarcomas, TGF-beta active genes blanco específicos necesarios para

adquirir un fenotipo maligno. En conclusión, se plantea que en la degeneración maligna de un osteocondroma a condrosarcoma, existe una disminución de la señalización Indian Hedgehog (ver figura 10).

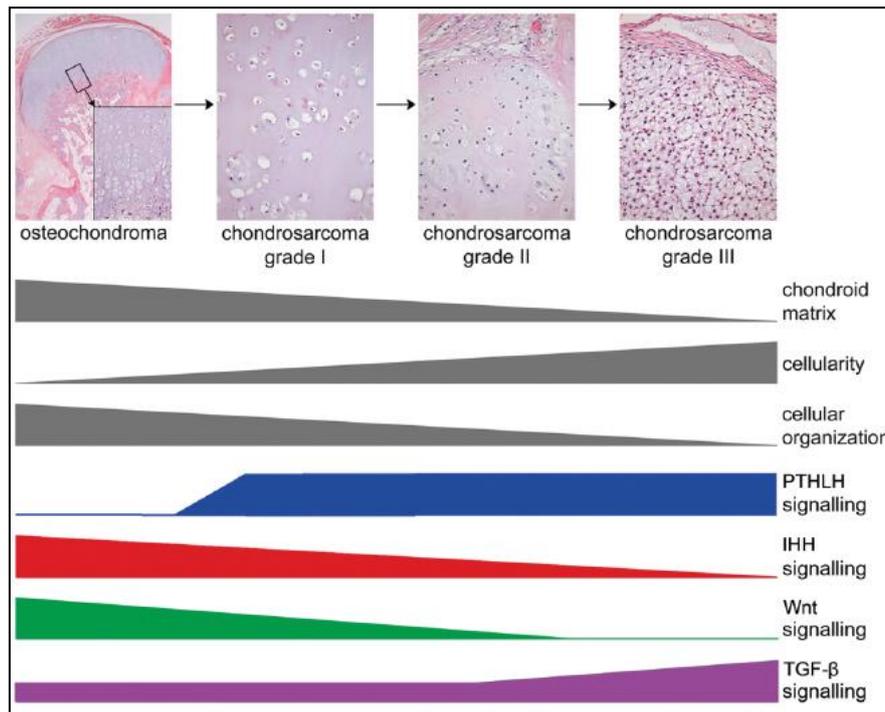


Figura 10. Tomado de Hameetman 2006. Representación esquemática de los cambios en la matriz extracelular, celularidad y la expresión de vías de señalización en el curso de la transformación maligna de los osteocondromas y subsecuente progresión a condrosarcoma periférico. Los diferentes tipos tumorales son representados por su histología. En los osteocondromas existe señalización IHH, Wnt y TGF- β , pero no PTHLH. Durante la transformación maligna de las células tumorales que han escapado del control de IHH, la vía de señalización PTHLH es activada, pero Wnt disminuye. Durante la progresión de lesiones grado I hacia grado III, la señalización IHH gradualmente disminuye (Hameetman et al 2006) y la señalización Wnt se pierde. La vía de señalización proliferativa TGF- β es sobre expresada durante la progresión y activa genes blanco necesarios para adquirir un fenotipo más maligno.

Correlación Genotipo-Fenotipo

En la OMH se ha reportado mayor severidad de la enfermedad en personas con mutaciones en EXT1, incluyendo mayor número de exostosis, complicaciones y riesgo de degeneración maligna a condrosarcoma. Por otro lado, la talla baja es aparentemente más común en personas con mutaciones en EXT1 (Porter et al 2004).

Mutaciones en OMH

La mayoría de las mutaciones reportadas en EXT1 y EXT2 son mutaciones sin sentido, de corrimiento del marco de lectura y de alteración del *splicing*, que dan lugar a haploinsuficiencia (tabla 1). En el gen EXT1 la mayoría de las mutaciones son de corrimiento del marco de lectura, del sitio de *splice* o mutaciones sin sentido que resultan en terminación prematura. No obstante, también se han identificado mutaciones de sentido equivocado (Cheung et al 2001). Los casos hereditarios y esporádicos se relacionan a estos loci ya conocidos, en los cromosomas 8 y 11 (EXT1 y EXT2).

En población estadounidense Hecht et al (1997) analizaron 6 familias con OMH, encontrando mutaciones en EXT1 en 4 de las familias analizadas. Estas mutaciones ocurren en los exones 1 y 2. Ellos identificaron mutaciones de sentido equivocado y cambio del marco de lectura, encontraron además mutaciones en EXT1 en 2 individuos que presentaron condrosarcoma. Estos autores sugieren un modelo en el cual múltiples eventos genéticos pueden ser necesarios para el desarrollo tumoral.

Chen y colaboradores (2006), analizaron una serie de pacientes taiwaneses y reportaron tres nuevas mutaciones; S277X en el gen EXT1 y G194X y 939+1G>A en el gen EXT2, además de una mutación ya conocida (Q172X) en el gen EXT2. En este estudio se da a conocer una nueva mutación sin sentido en EXT1 (S277X) y otra más en EXT2 (G194X), además de una nueva mutación del sitio de *splicing* (939+1G>A) en EXT2. Estos resultados demuestran que distintas mutaciones en EXT1 y EXT2 están presentes en población asiática con OMH.

En otra investigación, Cheung y colaboradores (2001) evaluaron el efecto in vivo de la actividad HS-polimerasa de mutaciones etiológicas de OMH identificadas en el locus EXT1 de individuos afectados y encontraron que no todas las mutaciones fueron inactivadoras. Estos resultados elevan las posibilidades de que estas mutaciones no están relacionadas a la patogénesis de la enfermedad y que EXT1 posee funciones adicionales aún no identificadas. En este estudio, muchas de las mutaciones reportadas mantienen la habilidad para sintetizar y expresar HS en la superficie celular. Las mutaciones de sentido equivocado pueden representar polimorfismos raros en el gen EXT1 o bien, pueden interferir con funciones aún no identificadas de EXT1 que pudieran estar involucradas en la patogénesis de OMH.

A pesar de que no se reconocían *hot spots* mutacionales para OMH, recientemente se ha reportado una mayor frecuencia de mutaciones en los exones 1, 2, 6 y 9 del gen EXT1 (tabla 1).

El análisis de mutaciones en familias con OMH permite no sólo proporcionar una adecuada asesoría genética, es posible además ofrecer la posibilidad de diagnóstico prenatal.

Tabla 1. Algunas de las mutaciones reportadas en Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria

Autor	Núm. de pacientes	Herencia	Gen	localización	Mutación	Consecuencia
Chen et al 2006	1	Familiar	EXT1	Exón 1	830C>G	Sin sentido
	1	Esporádico	EXT2	Exón 2	580G>T	Sin sentido
	1	Familiar	EXT2	Intrón 4	939+1 G>A	Splicing alterado
		Familiar	EXT2	Exón 1	514C>T	Sin sentido
Hecht et al 1997	6	Familia	EXT1	Exón 1	1364delC	Cambio del marco de lectura
	5	Familiar	EXT1	Exón 1	1035ins4	Cambio del marco de lectura
	8	Familiar	EXT1	Exón 2	G1635T	Sentido equivocado
Jennes et al 2008	1	Familiar	EXT1	Exón 1	c.247dupC	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 1	c.538-539delAG	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 1	c.560-	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 2	562delGT AinsC	Sentido equivocado
	1	Familiar	EXT1	Exón 2	c.992CA	Sentido equivocado

	1	Familiar	EXT1	Exón 2	c.992CA	Sentido equivocado
	1	Familiar	EXT1	Exón 6	c.1019GT	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 6	c.1431delC	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 9	c.1468dupC	Sin sentido
	1	Familiar	EXT1	Exón 10	c.1810G>T	Cambio del marco de lectura
	1	Familiar	EXT1	Exón 8	c.2051delG	Sin sentido
	1	Familiar	EXT1	Exón 8	c.1659C>A c.1685T>C	Sentido equivocado
Wells et al 1997	2	Familiar	EXT1	Exón 6	del T	Cambio de marco de lectura
	4	Familiar	EXT1	Exón 9	TGG→TAG	Sin sentido
	5	Familiar	EXT1	Exón 1	del G	Cambio de marco de lectura
	3	Familiar	EXT1	Exón 6	ins T	Cambio de marco de lectura
	3	Familiar	EXT1	Intrón 2	GT→AT	Splicing alterado
	3	Familiar	EXT1	Exón 1	Ins C	Cambio de marco de lectura

Tabla 2. Mutaciones con mayor frecuencia reportadas en EXT1

Gen	Mutación a nivel de DNA	Mutación a nivel protéico	Veces reportada
EXT1	c.1019G>A	p.Arg340His	27
	c.1469delT	p.Leu490ArgfsX9	27
	c.1018C>T	p.Arg340Cys	22
	c.1019G>T	p.Arg340Leu	19
	c.1468dupC	p.Leu490ProfsX31	9

Jennes et al 2009.

JUSTIFICACION

Los Osteocondromas son los tumores óseos benignos más comunes en la población. La Osteocondromatosis Hereditaria Múltiple es una enfermedad con una alta penetrancia y expresividad clínica variable intrafamiliar, lo que en algunos casos implica un deterioro importante en la calidad de vida del paciente y en los casos más severos la progresión hacia la malignidad. En México, no existen datos sobre la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, al tratarse de una enfermedad con un patrón de herencia mendeliano (autosómico dominante), tiene un elevado riesgo de recurrencia familiar. El Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) representa un lugar de referencia de padecimientos óseos, lo que lo convierte en uno de los principales motivos de consulta dentro del servicio de Tumores Óseos y Genética de nuestro instituto. Finalmente, consideramos este estudio tendrá utilidad para investigaciones futuras que se realicen en población mexicana, ya que permitiría identificar un patrón de mutaciones en la población mexicana. Esto nos permitirá distinguir las características de nuestra población con respecto a lo reportado en otros grupos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Analizar los exones 1, 2, y 9 del gen EXT1, en un grupo de pacientes mexicanos con Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria.

HIPOTESIS

Por tratarse de una investigación descriptiva, no requiere hipótesis.

OBJETIVO

Analizar por medio de la técnica de secuenciación los exones 1, 2, y 9 del gen EXT1 en un grupo de pacientes mexicanos.

MATERIAL Y METODO

Diseño

Investigación clínica descriptiva, transversal y observacional.

Población

Se incluyeron en el estudio a 14 pacientes con el diagnóstico clínico y radiológico de Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria.

Criterios de inclusión

1. Pacientes masculinos y femeninos de cualquier edad con el diagnóstico clínico y radiológico de Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria.
2. Pacientes que hayan aceptado de manera voluntaria participar en el estudio.

Criterios de eliminación

1. Muestra de DNA insuficiente para el análisis.

PROCEDIMIENTO

1.- Análisis clínico

Se captaron pacientes con el diagnóstico clínico de Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria, referidos al servicio de Genética por el Servicio de Tumores Óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Previa

explicación al paciente o tutor sobre el protocolo a realizarse, se procedió a recabar una hoja de consentimiento informado (anexo 1), así como una hoja de recolección de los datos clínicos más relevantes de la enfermedad (anexo 2). Se procedió a recabar radiografías simples de huesos largos (húmero, radio, cúbito, fémur, tibia y peroné), así como proyecciones de tórax, manos y pies en proyecciones anteroposterior y lateral, para poder integrar la hoja de recolección de datos. Con base en esta información, se corroboró el diagnóstico de Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria. Posteriormente se inició el procedimiento molecular.

2.- Análisis molecular

A) Extracción del DNA genómico

Se extrajo DNA de sangre periférica con método salino sin solventes orgánicos, bajo el siguiente procedimiento:

1. Se transfirieron 5 ml de sangre periférica a un tubo cónico de 15 ml y se agregó un volumen igual de solución TSS (Tris 10 mM a un pH de 7.6, tritón 1% y sacarosa 300 mM).
2. Se agitó el tubo por inversión.
3. Se centrifugó a 3000 rpm por 6 minutos.
4. Se decantó el sobrenadante.
5. Se agregó al botón de leucocitos 1 ml de solución TSS, se agitó resuspendiendo el botón y se pasó a un microtubo de 1.5 ml. Se agitó hasta homogenizar.
6. Se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm.

7. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se añadió nuevamente 1 ml de solución TSS (se repitieron de 2 a 3 veces los pasos 5-7).
8. Al botón limpio se agregaron 570 μ l de NaCl 5 mM, se agitó 2 minutos, se colocaron 30 μ l de SDS (duodecil sulfato de sodio) al 10% y se agitó por 5 minutos.
9. En ese mismo tubo se agregaron 200 μ l de NaCl saturado y se agitó por 10 minutos.
10. Se centrifugó a 11,500 rpm por 15 minutos a 4° C.
11. Se decantó el sobrenadante en un tubo de 13 x 100 mm estéril.
12. Se añadieron 2 ml de etanol absoluto a -20° C para precipitar el DNA.
13. Se tomó el DNA con una varilla de vidrio, y se lavó con etanol frío al 70%. Se evaporó el etanol en condiciones de esterilidad, posteriormente se resuspendió el DNA con agua estéril de acuerdo con el tamaño del botón.
14. Se colocó el tubo que contenía el DNA en baño María a 60° C durante 2 horas y posteriormente se guardó a -20° C hasta su uso.

B) Análisis espectrofotométrico del DNA genómico

1. Se realizó una dilución 2:98. Para ello se tomó una alícuota de 2 μ l de DNA y se colocó en un tubo eppendorf de 0.5 ml, se adicionaron 98 μ l de agua inyectable y se mezclaron.
2. Esta muestra se colocó en una celda y se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. A partir de estos valores se calculó la concentración y la pureza del DNA. A continuación se muestran las ecuaciones para obtener la concentración del DNA de doble cadena

(dsDNA), teniendo en cuenta que 1 D.O dsDNA (densidad óptica de DNA de doble cadena) = 50 ng/ml.

$$[\text{dsDNA}] = (1 \text{ D.O} \times 260 \text{ nm}) (50 \text{ ng/ml}) (\text{factor de dilución})$$

$$\text{pureza} = \text{absorbancia a } 260 \text{ nm} / \text{absorbancia a } 280 \text{ nm}$$

C) Amplificación de los exones 1, 2 y 9 del gen EXT1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* de síntesis de ácidos nucleicos, por la cual un fragmento particular de DNA es específicamente replicado, marcado por dos iniciadores que indican el comienzo de la secuencia a replicar, la cual se somete a ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y extensión con la enzima Taq DNA polimerasa. Se obtienen así múltiples copias de la secuencia de interés.

Tabla 3.- Pares de iniciadores de los exones 1, 2 y 9 del gen EXT1 y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los productos de PCR.

Exón	Secuencias de los iniciadores (5'→3')	Tamaño del producto de PCR (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
1	F: 5' GTGCAGAGTCTCCACTTGTG 3' R: 5' GATTTGCTCAGTTCCAGGCT 3'	571	64
2	F: 5' GAAAAGTGAGAGCTGCCTGC 3' R: 5' GAGTAAATCCTCCCTCCACC 3'	415	64
9	F: 5' CACAGTCCCCGGATTTTGCA 3' R: 5' CTCAGTGATGAATCCCAAGC 3'	615	64

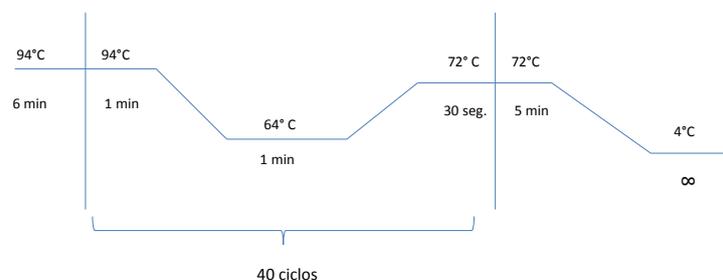
Chen et al 2006.

Se realizó la amplificación de 3 pares de iniciadores (tabla 3). A continuación se muestran las condiciones generales de la PCR, en donde cada tubo de 0.2 ml contenía sólo un par de iniciadores.

Reactivo/exón	1, 2, 9
Solución amortiguadora 10X	1x
Desoxinucleótidos	0.2 mM
Iniciador F	0.5 μ M
Iniciador R	0.5 μ M
Cloruro de magnesio	1.5 mM
Enzima Taq Polimerasa 5U/ μ l	1 U
DNA genómico	100 ng
Agua inyectable	c.b.p 20 μ l

Programa en el termociclador

El programa de amplificación para los diferentes exones fue:



Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas de cada exón amplificado fueron cortadas y procesadas por la técnica de Qiaex II.

D) Técnica de extracción de DNA del gel de agarosa (Qiaex II)

- 1.- Se adicionaron 300 µl de solución amortiguadora QX1 (con indicador de pH) a un microtubo de 1.5 mL que contenía el fragmento del gel de agarosa y se mezclaron manualmente hasta la disolución del gel.
- 2.- En ese mismo tubo se colocaron 10 µl de resina QIAEX® II.
- 3.- Se incubó el microtubo durante 15 minutos a 50° C y se agitó de manera constante durante el tiempo de incubación.
- 4.- Se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm y posteriormente decantó el sobrenadante.
- 5.- El botón se resuspendió en 500 µl de solución amortiguadora QX1.
- 6.- Se centrifugó 2 minutos a 14,000 rpm y posteriormente se decantó el sobrenadante.
- 7.- Se resuspendió el botón en 500 µl de solución amortiguadora PE.
- 8.- Se centrifugó 2 minutos a 14,000 rpm y posteriormente se decantó el sobrenadante.
- 9.- Se repitieron los pasos 7 y 8 una vez más
- 10.- Se dejó secar el botón durante 25 minutos.
- 11.- Se adicionó al microtubo que contenía el botón 30 µl de agua estéril.
- 12.- Se Incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación manual constante.

13.- Se incubó una vez más por 5 minutos a 50° C, con agitación manual constante.

14.- Se centrifugó por 2 minutos a 14,000 rpm y con una punta obtuvo el sobrenadante y colocó en un tubo estéril de 0.5 µl.

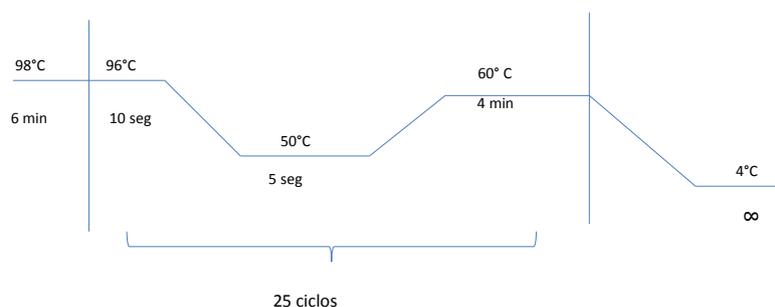
15.- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con una alícuota de 5 µl del sobrenadante.

E) PCR de secuencia

En la PCR para secuenciación se agregó un oligonucleótido (F o R) en el tubo de reacción que pertenecía al exón correspondiente. En un tubo de 0.2 mL se adicionaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración
Big Dye de terminación V3.1	1 µl
Iniciador F ó R	0.48 µM
DNA	30-60 ng
Agua estéril	c.b.p 10 µl

Programa en el termociclador



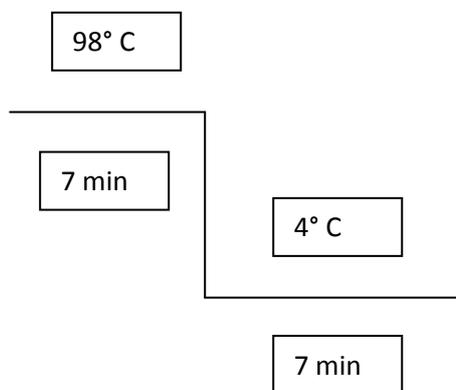
F) Filtración del producto de PCR para secuenciación

Para filtrar cada producto que se amplificó para secuenciación, se utilizó de manera individual una columna de centrifugación centri-sep, lo que permitió excluir sales, DNTPs e impurezas de bajo peso molecular.

- 1.- Se adicionaron a una columna 800 µl de agua estéril.
- 2.- Se dejó reposar al menos 1 h.
- 3.- En la parte inferior de la columna colocó la base recolectora de desechos y se centrifugó a 3,000 rpm a 22° C por 5 minutos.
- 4.- Se sustituyó la base recolectora por un tubo eppendorf de 0.5 ml.
- 5.- Se adicionó a la columna 10 µl del producto de PCR para secuenciación y se centrifugó a 3,000 rpm a temperatura ambiente, por 4 minutos.
- 6.- El filtrado que se obtuvo en el tubo eppendorf se colocó dentro del concentrador de DNA a 30° C durante 35 minutos.

7.- Al botón seco que se obtuvo, se agregaron 13 μ l de formamida desionizada.

8.- Se mezcló y se desnaturalizó la muestra con el siguiente programa:



Las muestras se colocaron en la gradilla del secuenciador ABI PRISM 310.

RESULTADOS

Resultados del análisis clínico

En el estudio se incluyeron 14 pacientes mexicanos con diagnóstico clínico y radiológico de OMH

De los 14 pacientes, 8 son de sexo femenino y 6 masculinos, con rango de edad entre 10 y 56 años, y con promedio de 24.5 años. 7 pacientes son originarios del D.F., 4 son originarios del Edo. de México, 2 del estado de Veracruz y 1 del estado de Guerrero. En la tabla 4 se resumen las características clínicas de los 14 pacientes estudiados.

Tabla 4. Características clínicas de los 14 pacientes estudiados.

Paciente	Presentación	Edad al momento del diagnóstico	Múltiple / Unifocal	Localización anatómica	Anomalías asociadas
1	Familiar	Nacimiento	Múltiple	1, 2, 4, 5, 6	Condrosarcoma de bajo grado
2	Familiar	-	Múltiple	1, 2, 3, 5, 6	
3	Esporádico	3 años	Múltiple	1, 2, 3, 6	
4	Esporádico	6 años	Múltiple	1, 2, 3, 5, 6	
5	Familiar	5 años	Múltiple	1, 3, 6	
6	Familiar	47 años	Múltiple	1, 5, 6	
7 A	Familiar	5 años	Múltiple	1, 3, 5, 6	Hiperlaxitud articular
7 B	Familiar	-	Múltiple	-	
8 A	Familiar	3 años	Múltiple	1, 5, 6	Hiperlaxitud articular
8 B	Familiar	-	Múltiple	-	
9 A	Familiar	20 años	Múltiple	1	Diabetes mellitus
9 B	Familiar	9 años	Múltiple	1, 6	Diabetes mellitus / HTA
9 C	Familiar	Nacimiento	Múltiple	1, 2	Talla baja / HTA
9 D	Familiar	6 años	Múltiple	1, 2, 3, 4, 5, 6	

1: Rodilla, 2: Antebrazo, 3: Tobillo, 4: Escápula, 5: Brazo, 6: Otro sitio. HTA: hipertensión arterial.

A continuación se presentan con más detalle las características clínicas de los pacientes incluidos en nuestro estudio:

- Paciente 1 (AAA). Originario del D. F. De sexo masculino, tiene 19 años de edad y le fue diagnosticada la enfermedad al nacimiento. Cuenta con historia familiar positiva para la enfermedad (árbol genealógico figura 11). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, antebrazo, escápula, húmero y otros sitios), deformidad y dolor. Ha sido sometido a cirugía para resección de osteocondromas en 10 ocasiones.

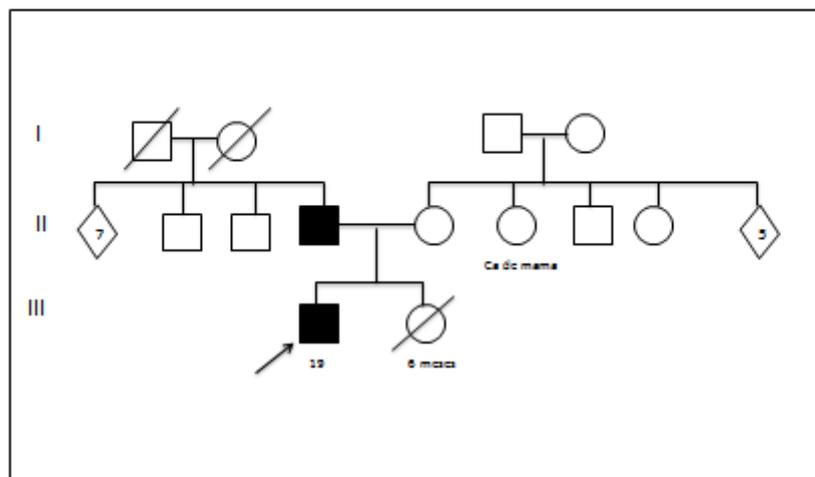


Figura 11. Árbol genealógico del paciente número 1, en donde se observa la transmisión vertical, característico de un patrón de herencia autosómico dominante. Con una flecha se señala nuestro caso en estudio.

- Paciente 2 (CQR). Originario del Edo. de México. De sexo masculino, tiene 17 años de edad, desconocemos la edad a la que se le realizó el diagnóstico. Cuenta con historia familiar positiva para la enfermedad.

Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, brazo, antebrazo, tobillo y otros sitios), deformidad y dolor. Ha sido sometido a cirugía para resección de osteocondromas en 2 ocasiones. Cuenta con reporte de lesión neoplásica maligna (condrosarcoma de bajo grado) en pelvis izquierda.

- Paciente 3 (RVJ). Originaria del D. F. De sexo femenino, tiene 10 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 3 años. No cuenta con historia familiar del padecimiento (árbol genealógico figura 12). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, antebrazo, tobillo y otros sitios), deformidad, dolor. Ha sido sometida a cirugía para resección de osteocondromas en una ocasión. Se muestran fotos clínicas de la paciente en las figuras 13-14, en donde se muestra la deformidad que presenta en extremidades y en parilla costal.

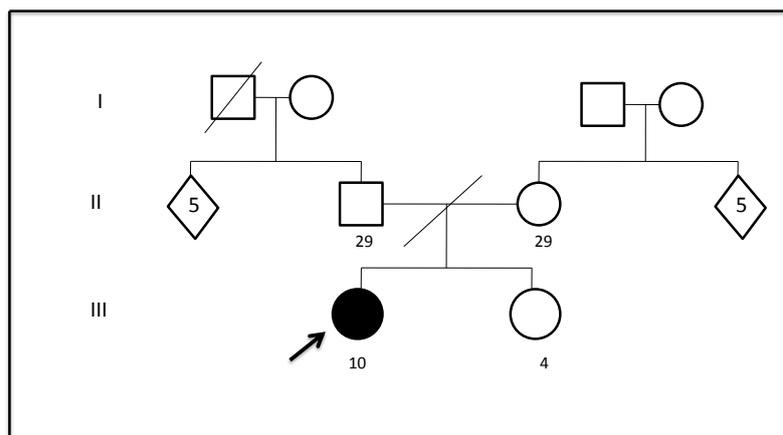


Figura 12. Árbol genealógico de la paciente número 3, en donde se observa un caso aislado por una mutación *de novo*. Con una flecha se señala nuestro caso en estudio.



Figura 13. Paciente 3. Se observa deformidad en ambos antebrazos.



Figura 14. Paciente 3. Se observa presencia de osteocondroma en región costal izquierda y en antebrazo.

- Paciente 4 (JVA). Originario de Guerrero. De sexo masculino, tiene 16 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 6 años. No cuenta con historia familiar del padecimiento (árbol genealógico figura 15). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, brazo, antebrazo, tobillo, y otros sitios), deformidad y dolor. Ha sido sometido a cirugía para resección de osteocondromas en dos ocasiones.

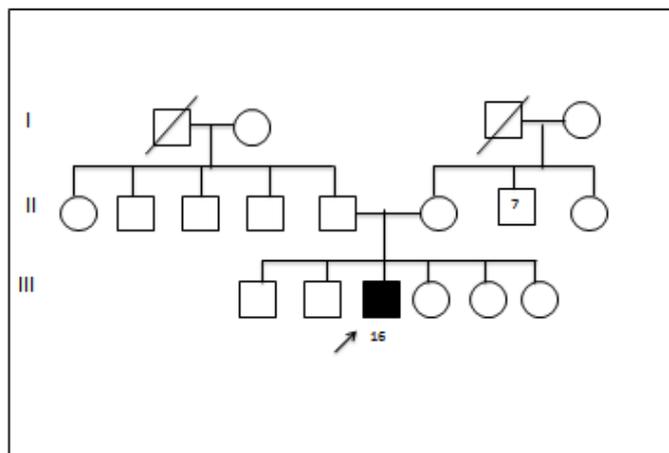


Figura 15. Árbol genealógico del paciente número 4, en donde se observa un caso aislado por una mutación *de novo*. A pesar de ser un caso aislado, presenta un fenotipo severo. Con una flecha se señala nuestro caso en estudio.

- Paciente 5 (RUM). Originaria del Edo. de México. De sexo femenino, tiene 30 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 5 años. Cuenta con historia familiar positiva para la enfermedad (árbol genealógico figura 16). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, tobillo y otros sitios), deformidad y dolor. Ha sido sometida a cirugía para resección de osteocondromas en varias ocasiones.

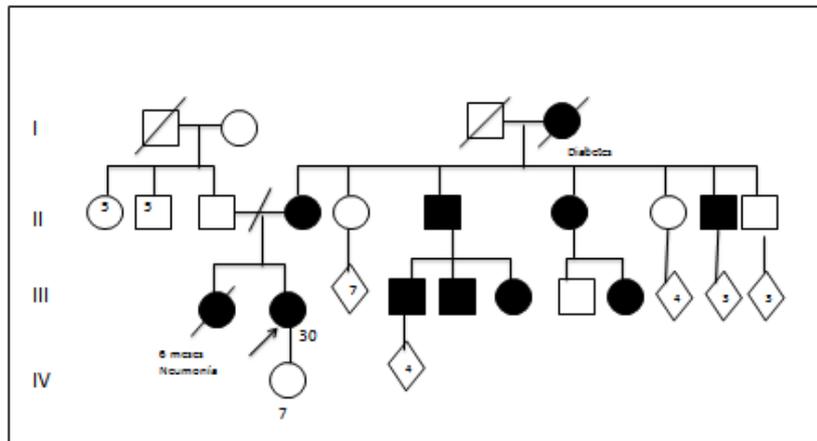


Figura 16. Árbol genealógico de 4 generaciones de la paciente 5, en donde se observan múltiples afectados y un patrón característico de herencia autosómica dominante por rama materna. Nuestro caso en estudio se señala con una flecha.

- Paciente 6 (MBV). Originaria del D. F. de sexo femenino, tiene 48 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 47 años por antecedente de hijos con la enfermedad (árbol genealógico figura 17). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, húmero y otros sitios) y dolor.

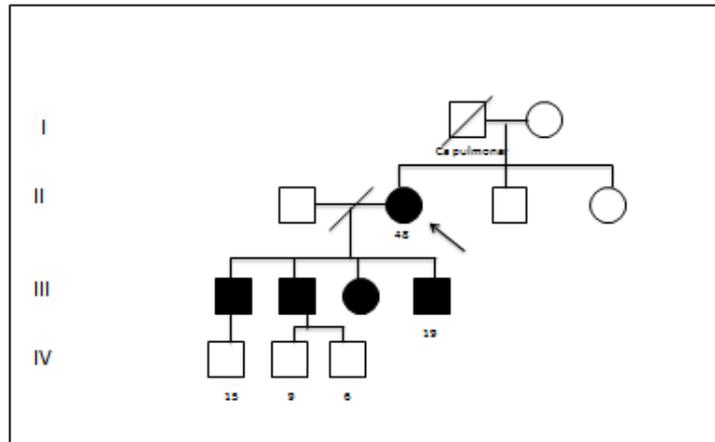


Figura 17. Árbol genealógico de la paciente número 6, la cual es señalada con una flecha. Nuestro caso en estudio presentó una mutación *de novo*, a partir de la cual se transmitió la enfermedad con un patrón de herencia dominante, presentando la enfermedad sus 4 hijos.

- Paciente 7A (ARA). Originaria del Edo. de México. De sexo femenino, tiene 12 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 5 años. Cuenta con historia familiar del padecimiento (árbol genealógico figura 18). Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, tobillo, húmero y otros sitios) y deformidad. Ha sido sometida a cirugía para resección de osteocondromas en dos ocasiones.
- Paciente 7B (AFJC). Masculino de 33 años de edad. Es el padre de la paciente número 7A. No contamos con más datos clínicos. Árbol genealógico figura 18.

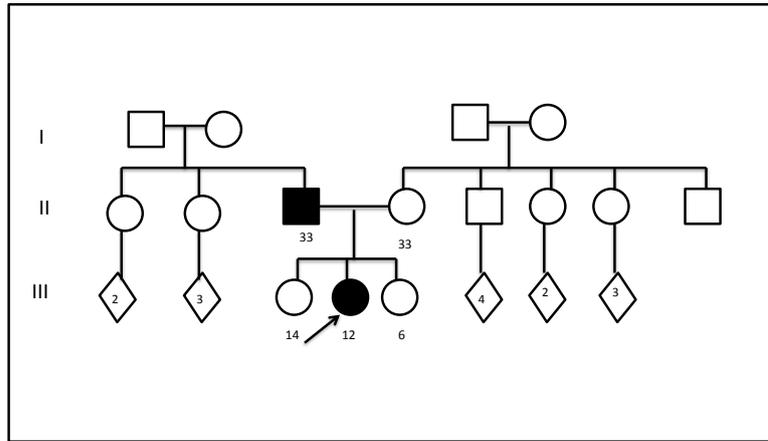


Figura 18. Árbol genealógico de los pacientes 7A y 7B. En donde se observan 2 pacientes afectados. Con una flecha se señala la paciente número 7A. El varón afectado corresponde al paciente número 7B.

- Paciente 8A (PGA). Originaria del estado de Veracruz. De sexo femenino, tiene 11 años de edad y le diagnosticaron la enfermedad a los 3 años. Cuenta con historia familiar del padecimiento. Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodilla, húmero y otros sitios), deformidad y dolor. Presenta además la asociación de hiperlaxitud articular. Ha sido sometida a cirugía para resección de osteocondromas en dos ocasiones.
- Paciente 8B (GVL). Madre de la paciente 8A. No contamos con más datos clínicos de ésta paciente.
- Paciente 9A (DGB). Originario del D.F. De sexo masculino, tiene 56 años de edad, y se le diagnosticó la enfermedad a los 20 años. Cuenta

con historia familiar positiva para la enfermedad (árbol genealógico figura 19). Tiene 3 hijos vivos afectados, dos mujeres y un varón, siendo éste último el más severamente afectado. Clínicamente presenta osteocondromas múltiples (rodillas) y dolor. Cuenta además con el diagnóstico de diabetes mellitus. Ha sido sometido a cirugía para resección de osteocondromas.

- Paciente 9B (DHY). Hija del paciente 9A. De sexo femenino, tiene 29 años de edad, y se le diagnosticó la enfermedad a los 9 años. Tiene una hija de 7 años de edad con la enfermedad. Clínicamente no tiene un fenotipo severo, presenta localización anatómica de osteocondromas sólo en rodillas y refiere dolor. Cuenta además con los diagnósticos de diabetes mellitus e hipertensión arterial. Árbol genealógico figura 19.
- Paciente 9C (DHM). Hija del paciente 9A. De sexo femenino, tiene 20 años de edad y se le diagnosticó la enfermedad al nacimiento. Clínicamente, al igual que la paciente 9B, no presenta un fenotipo severo. Presenta localización de osteocondromas en rodillas y antebrazo, además de deformidad. Árbol genealógico figura 19.
- Paciente 9D (DHB). Hijo del paciente 9A. De sexo masculino, tiene 26 años de edad y se le diagnosticó la enfermedad a los 6 años. Clínicamente a diferencia de sus hermanas, presenta un fenotipo severo con presencia de deformidad y dolor. Presenta localización anatómica de osteocondromas en rodillas, brazo, antebrazo, tobillo, escápula, y otros sitios. Ha sido sometido a cirugía para resección de osteocondromas en una ocasión, en donde se extrajo un osteocondroma gigante de la escápula derecha. Presenta talla baja. Cuenta además con

el diagnóstico de hipertensión arterial, diagnosticada a los 25 años de edad. Árbol genealógico figura 19.

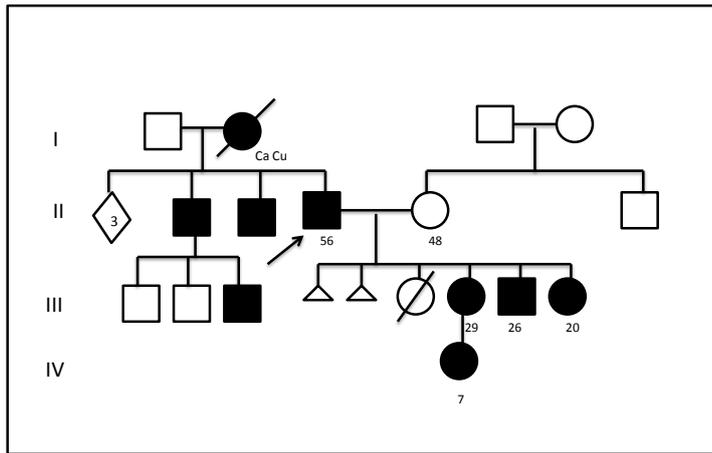


Figura 19. Árbol genealógico del paciente número 9A, en donde se observa un patrón de herencia autosómico dominante. Nuestro caso en estudio tiene 3 hijos afectados, siendo el varón el más severamente afectado.

Hallazgos radiológicos.

Se solicitaron radiografías de huesos largos, tórax óseo, manos y pies, para un escaneo completo en la búsqueda de osteocondromas. Radiológicamente encontramos la presencia de dos o más osteocondromas en nuestra serie de pacientes, con los hallazgos característicos de un flujo ininterrumpido del hueso cortical y medular dentro del osteocondroma. No encontramos datos de lesiones osteolíticas o de malignidad en ninguno de nuestros casos (el paciente previamente referido con condrosarcoma ya había sido sometido a resección del mismo). Las figuras 20-22 corresponden a la paciente número 3, en donde se pueden observar los hallazgos radiológicos característicos de la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria. Figuras 23 y 24: imágenes características de osteocondromas que condicionan deformidad del antebrazo.



Figura 20. Radiografía de antebrazo de la paciente 3, en donde se observan osteocondromas en tercio distal de radio y cúbito.



Figura 21. Otra proyección del brazo y antebrazo de la paciente 3.



Figura 22. Radiografía contralateral de brazo y antebrazo de la paciente 3, en donde se observan osteocondromas en tercio distal de radio y cúbito, que condicionan deformidad de antebrazo.



Figura 23. Imagen en donde se observan las características radiológicas de la OMH: flujo ininterrumpido del hueso cortical y medular dentro del osteocondroma.



Figura 24. Imagen radiológica característica de un osteocondroma.

Resultados del análisis molecular

Se realizó secuenciación de los exones 1, 2 Y 9 del gen EXT1 en 14 pacientes con el diagnóstico de Exostosis Múltiple Hereditaria. De los exones 2 y 9 se incluyeron las uniones intrón-exón tanto en 5´ como en 3´. Con respecto al exón 1, se secuenció parte de la segunda mitad de éste exón (ver figura 29).

Exón 1

El exón 1 de EXT1 está conformado por un fragmento de 1735 nucleótidos, de los cuales fueron secuenciados 431 nucleótidos (figura 29), abarcando 140 nucleótidos del intrón 1 hacia 3´. Fue secuenciado con los *primers* referidos en la tabla 3. No se encontraron mutaciones de acuerdo a la secuencia de referencia de GenBank para EXT1: NG_007455.1. Ver figura 25.

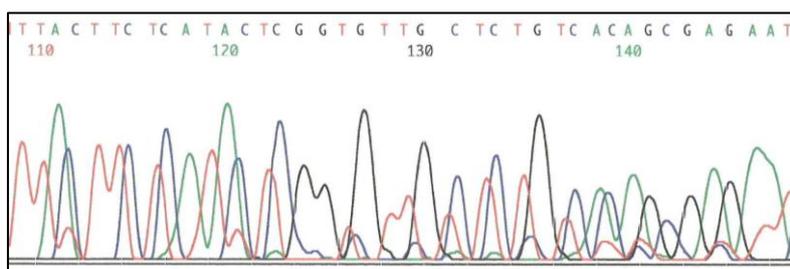


Figura 25. Se muestra parte de la secuencia del exón 1.

Exón 2

El exón 2 de EXT1 está conformado por un fragmento de 94 nucleótidos. Fue secuenciado con los *primers* referidos en la tabla 3, abarcando 137 nucleótidos del intrón 1 hacia 5' y 184 nucleótidos del intrón 2 hacia 3' (figura 26). No se encontraron mutaciones de acuerdo a la secuencia de referencia de GenBank para EXT1: NG_007455.1.

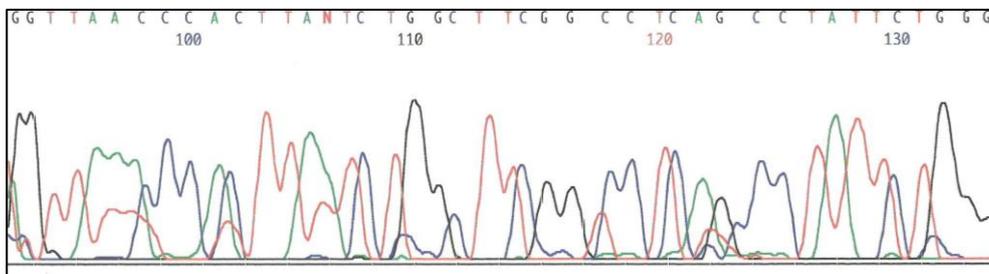


Figura 26. Se muestra parte de la secuencia del exón 2.

Exón 9

El exón 9 está conformado por un fragmento de 161 nucleótidos. Fue secuenciado con los *primers* referidos en la tabla 3, abarcando 105 nucleótidos del intrón 8 hacia 5' y 349 nucleótidos del intrón 9 hacia 3'. De acuerdo a la secuencia de GenBank: NG_007455.1 para el exón 9, encontramos un cambio de T por G, que condiciona un cambio de aminoácidos (E587D). Lo anterior fue encontrado en todos nuestros pacientes analizados. Lo anterior nos hace pensar en una mutación o en un polimorfismo presente en población mexicana, por lo cual en un futuro se secuenciará un grupo mayor de controles sanos para corroborar o descartar lo anterior. Figuras 27 y 28.

En la tabla 5 se concentran los hallazgos moleculares encontrados en este grupo de pacientes.

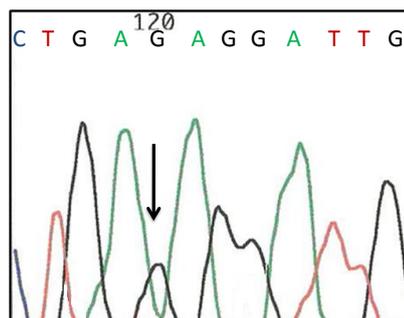


Figura 27. Se muestra parte de la secuencia del exón 9, de un control sano. Con una flecha se señala el sitio donde encontramos el cambio de nucleótido en nuestros pacientes analizados.

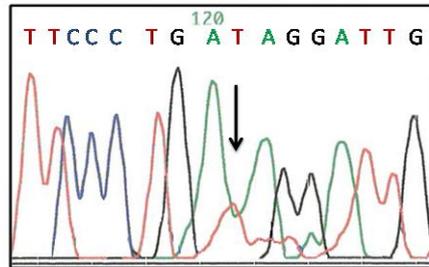


Figura 28. Se muestra parte de la secuencia del exón 9 de un paciente con Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria, en donde se observa el cambio de T por G en la secuencia (indicado con una flecha).

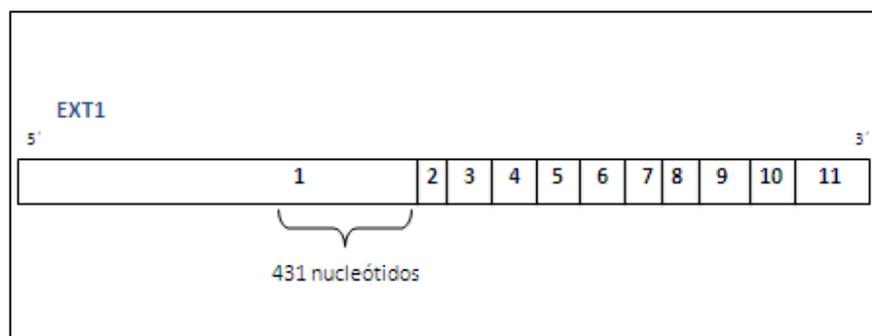


Figura 29. Representación esquemática de la región codificante de EXT1, ilustrando la región que se secuenció del exón 1 en éste trabajo.

Tabla 5. Concentrado de los hallazgos moleculares en los 14 pacientes estudiados

Pacientes	Exón 1	Exón 2	Exón 9
1	Normal	Normal	E587D
2	Normal	Normal	E587D
3	Normal	Normal	E587D
4	Normal	Normal	E587D
5	Normal	Normal	E587D
6	Normal	Normal	E587D
7 A	Normal	Normal	E587D
7 B	Normal	Normal	E587D
8 A	Normal	Normal	E587D
8 B	Normal	Normal	E587D
9 A	Normal	Normal	E587D
9 B	Normal	Normal	E587D
9 C	Normal	Normal	E587D
9 D	Normal	Normal	E587D

DISCUSION

La Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria (OMH), antes llamada Exostosis Múltiple Hereditaria, se caracteriza por la presencia de múltiples osteocondromas (tumores óseos benignos cubiertos de cartílago), se localizan predominantemente en las metáfisis de los huesos largos, lo que puede condicionar la presencia de dolor, deformidades óseas y talla baja. En los casos severos ocurre degeneración maligna y decremento en la calidad de vida debido a las múltiples intervenciones quirúrgicas que se requieren para resección de los osteocondromas. Esta enfermedad presenta un patrón de herencia mendeliano (autosómico dominante), con una penetrancia elevada, de más del 95%. Su prevalencia es de 1 en 50,000 individuos dentro de la población general y parece ser más frecuente en varones. Clínicamente la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria se caracteriza por la presencia de 2 o más osteocondromas en huesos largos, los cuales aparecen principalmente en la primera década de la vida, disminuyendo el crecimiento cuando las placas de crecimiento se cierran en la pubertad. El número de osteocondromas puede variar significativamente dentro y entre familias. Se han identificado 2 genes, cuyas mutaciones están relacionadas con la enfermedad: EXT1 y EXT2, mapeados en 8q24 y 11p11-p12 respectivamente. Ambos genes codifican para glucosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de heparán sulfato (HS), pero hasta el momento no se conoce por completo el mecanismo fisiopatogénico de la enfermedad.

La OMH es una enfermedad con una alta penetrancia, que determina que una vez adquirido el genotipo por algún miembro de la familia, existe un riesgo elevado de recurrencia. Aunado a lo anterior, existe la imposibilidad de

determinar qué tan severo será el fenotipo en un paciente una vez que haya heredado la mutación. En general, se ha observado una mayor severidad del fenotipo en pacientes varones, pero también se han reportado fenotipos severos en mujeres. La interrogante sobre qué factores son los que determinan la severidad del fenotipo permanece sin respuesta. Clínicamente se ha observado mayor severidad del fenotipo en varones (pacientes 1, 2 y 9D), sin embargo, nosotros observamos un fenotipo severo en una de nuestras pacientes del sexo femenino (paciente 3). Dos de nuestros casos fueron diagnosticados en la edad adulta (pacientes 6 y 9D), lo cual no significa que hayan desarrollado los osteocondromas en la vida adulta. La deformidad, la presencia de dolor y las intervenciones quirúrgicas son una constante en nuestros pacientes, la talla baja, no fue un dato clínico común en nuestros casos, ya que sólo lo encontramos en un individuo (9D). La progresión a malignidad se desarrolló sólo en un paciente de nuestra serie (caso 2).

Con respecto a la localización anatómica de los osteocondromas, encontramos hallazgos semejantes a lo reportado en la literatura, siendo el sitio anatómico más frecuentemente afectado, la rodilla (presente en el cien por ciento de nuestros pacientes), seguido del brazo (50%) y antebrazo (42%). No encontramos asociaciones relevantes en nuestro estudio, a excepción de hiperlaxitud articular, diabetes mellitus e hipertensión arterial, en los casos 8 A, 9 A, 9 B y 9 D respectivamente.

La mayoría de nuestros pacientes cuentan con antecedentes familiares de la enfermedad (10 de 12 pacientes evaluados).

En este estudio se describe una serie de pacientes mexicanos con OMH, el cual es el primero en su tipo que realiza el análisis molecular del gen EXT1 en nuestra población. A pesar de que nuestro estudio sólo incluye 14 pacientes, nos permite darnos una idea de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, sus complicaciones y el genotipo de nuestra población, en donde encontramos una sustitución de T por G en el exón 9 del gen EXT1 en todos los casos analizados. Lo anterior, es el primer reporte molecular de la OMH en población mexicana.

A pesar de que la OMH no es una enfermedad letal que acorte las expectativas de vida, si puede afectar la calidad de vida del paciente en demasía, ya que los osteocondromas condicionan dolor, deformidades, compresión nerviosa, múltiples ingresos a quirófano para resección de osteocondromas y riesgo de malignidad, por lo que consideramos relevante este tipo de estudios. Hasta el momento, se ha adjudicado proporcionalmente mayor frecuencia de mutaciones a EXT1 vs EXT2, sin embargo, lo anterior parece depender del grupo poblacional estudiado, ya que en población asiática se ha observado mayor prevalencia de mutaciones en EXT2 vs EXT1. De igual manera, la mayor severidad del fenotipo se ha adjudicado a mutaciones en EXT1, sin embargo, hay que reconocer que la mayoría de los estudios moleculares se han enfocado a la búsqueda de mutaciones en EXT1. Por lo anterior, consideramos de importancia conocer el genotipo de ésta enfermedad en población mexicana, para así establecer una correlación genotipo-fenotipo.

CONCLUSIONES

La OMH es una enfermedad genética con una penetrancia casi del 100% y una expresividad variable que determina un fenotipo leve o severo difícil de predecir. Realizamos un estudio descriptivo clínico y molecular de pacientes mexicanos con OMH.

Este es el primer estudio que se realiza en población mexicana para búsqueda de mutaciones en EXT1. Con base a los hallazgos en nuestra serie de pacientes estudiados, la talla baja no es hallazgo frecuente en nuestra serie.

La presencia de dolor, deformidad y antecedentes de intervenciones quirúrgicas son datos frecuentes en nuestros casos analizados.

Finalmente, la localización anatómica de los osteocondromas corresponde a lo descrito en la literatura médica.

Desde el punto de vista molecular es necesario analizar un número mayor de pacientes para poder establecer si la sustitución de bases encontrada corresponde a una mutación o bien, a un polimorfismo presente en la población mexicana.

Finalmente, a futuro continuaremos el estudio molecular en nuevos casos con OMH, con el fin de confirmar si se mantiene el patrón de mutaciones o si se detectan nuevos cambios.

ANEXOS

Anexo 1.- Carta de consentimiento informado



**INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
SERVICIO DE GENÉTICA
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

A quien corresponda:

Por medio de la presente hago constar que he dado mi consentimiento para que me sea extraída la cantidad de 5-7 ml de sangre venosa periférica con el objeto de analizar molecularmente algunos genes (EXT1) relacionados con el origen de mi enfermedad (*Osteocondromatosis múltiple*). Este estudio se llevará a cabo en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación, lo cual he aceptado libre y voluntariamente. Además, he sido informado sobre el procedimiento del estudio. La información obtenida será confidencial. Tengo el entendimiento que de este estudio se obtendrá como beneficio el desarrollo de procedimientos diagnósticos más eficaces y un mejor conocimiento para el manejo de mi enfermedad. Por otra parte, estoy en libertad de retirarme del estudio en el momento que lo desee sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba en el Instituto.

NOMBRE DEL PACIENTE:

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR:

TESTIGO:

Teléfono:

Servicio de Genética.

Dra. Margarita Valdés Flores

Dr. Diego León Zaragoza

Anexo 2.- Hoja de recolección de datos (anverso)



**INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
SERVICIO DE GENETICA
PROTOCOLO DE OSTEOCONDROMATOSIS**

Nombre del paciente:

Número de Expediente:

Expediente de genética:

Fecha de nacimiento:

Lugar de origen:

Teléfono:

Sexo	Hombre		Mujer		
Edad					
Edad al momento del diagnóstico					
Deformidad (mano, antebrazo, rodilla, tobillo, etc.)	Si		No		
Historia familiar	Positiva		Negativa		
Presencia de dolor	Si		No		
Talla baja	Si		No		
Cirugías/Malignización	Si		No		
Localización	Rodilla	Antebrazo	Tobillo	Escápula	Húmero
Otros:					
Asociaciones					
AHF de cáncer					
Estudios realizados (TAC, gammagrama...)	Toma de muestra de DNA: (si) (no)				

Anexo 2.- Hoja de recolección de datos (reverso)



Marque la localización anatómica de los osteocondromas

Dibuje el árbol genealógico

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahn J, Ludecke H-J, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, et al. Cloning of the putative tumor suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 1995; 11:137-143.

Bellaiche Y, Perrimon N. Hedgehog movement is regulated through tout velu dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell* 1999;4:633–639.

Bellaiche Y, The I, Perrimon N (1998) Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor Ext-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394:85–88.

Bernard MA, Hall CE, Hogue DA, Cole WG, Scott A, Snuggs MB, Clines GA, Ludecke HJ, Lovett M, Van Winkle WB, Hecht JT (2001). Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 48:149–162.

Bernard MA, Hogue DA, Cole WG, Sanford T, Snuggs MB, Montufar-Solis D, Duke PJ, Carson DD, Scott A, Van Winkle WB, Hecht JT (2000) Cytoskeletal abnormalities in chondrocytes with EXT1 and EXT2 mutations. *J Bone Miner Res* 15:442–450.

Bornemann DJ, Duncan JE, Staatz W, Selleck S, Warrior R. Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 2004;131:1927–1938.

Bové JVMG, Van den Broek LJCM, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW. Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma. *Lab Invest* 2000;80:1925–1933.

Bové JVMG, Cleton-Jansen AM, Wuyts W, Caethoven G, Taminiau AHM, Bakker E, *et al.* EXT-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas. *Am J Hum Genet* 1999;65:689–698.

Busch C, Hofmann F, Selzer J, Munro S, Jeckel D, Aktories K (1998) A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem* 273:19566–19572.

Chen WC, Chi CH, Chuang CC, Jou IM. Three novel Ext1 and EXT2 gene mutations in Taiwanese patients with multiple exostoses. *J Formos Med Assoc* 2006; 105:434-437.

Cheung PK, McCormick C, Crawford BE, Esko JD, Tufaro F, Duncan G. Etiological Point Mutations in the Hereditary Multiple Exostoses Gene *EXT1*: A

Functional Analysis of Heparan Sulfate Polymerase Activity. *Am J Hum Genet* 2001; 69:55-66.

Duncan G, McCormick C, Tufaro F. The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins. *J. Clin. Invest.* 2001. 108:511-516.

Hameetman L, Kok P, Eilers PHC, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW, Bovée JVMG. The use of Bcl-2 and PTHLH immunohistochemistry in the diagnosis of peripheral chondrosarcoma in a clinicopathological setting. *Virchows Arch* 2005;446:430–437.

Hameetman L, Rozeman LB, Lombaerts M, Oosting J, Taminiau AHM, Cleton-Jansen A-M, Bovée JVMG and PCW Hogendoorn. Peripheral chondrosarcoma progression is accompanied by decreased Indian Hedgehog signaling. *J Pathol* 2006; 209: 501–511.

Hameetman L, David L, Yavas A, White SJ, Taminiau AHM, Cleton-Jansen A-M, Hogendoorn PCW and Bovée JVMG. Decreased EXT expression and intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and peripheral chondrosarcomas. *J Pathol* 2007; 211: 399–409.

Hecht JT, Hogue D, Wang Y, Blanton SH, Wagner M, Strong LC, Raskind W, Hansen MF, Wells D. Hereditary Multiple Exostoses (EXT): Mutational Studies

of Familial EXT1 Cases and EXT-Associated Malignancies. *Am. J. Hum. Genet* 1997; 60:80-86.

Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, Casey B, Bakker B, Sangiorgi L, and Wuyts W. Multiple Osteochondromas: Mutation Update and Description of the Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb). *Hum Mutat* 2009; 12:1620-1627.

Jennes I, Entius MM, Van Hul E, Parra A, Sangiorgi L, Wuyts W. Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *J Mol Diagn.* 2008; 10: 85–92.

Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, TajimaM, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S, Okamoto H (2000a). Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. *J Biol Chem* 275:10723–10726.

Kobayashi S, Morimoto K, Shimizu T, Takahashi M, Kurosawa H, Shirasawa T (2000b). Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 268:860–867.

Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell* 2004;**6**:801–813.

Krooth RS, Macklin MT, Hislbish TF. Diaphysial aclasis (multiple exostoses) on Guam. *Am J Hum Genet.* 1961; 13: 340–7.

Legeai-Mallet L, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M. Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses. *Clin Genet.* 1997; 52: 12–6.

Le Merrer M, Legeai-Mallet L, Jeannin PM, Horsthemke B, Schinzel A, Plauchu H, Toutain A, Achard F, Munnich A, Maroteaux P. A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 717–22.

Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, Matzuk MM (2000) Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224:299–311.

Lin X, Wells D (1997) Isolation of the mouse cDNA homologous to the human EXT1 gene responsible for hereditary multiple exostoses. *DNA Seq* 7:199–202.

McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:668–673.

McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, Tufaro F (1998) The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet* 19:158–161.

Porter DE, Lonie L, Fraser M, Dobson-Stone C, Porter JR, Monaco AP, Simpson AH. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study. *J Bone Joint Surg Br.* 2004; 86: 1041–6.

Schmale GA, Wuyts W, Chansky HA, Raskind WH. Hereditary Multiple Osteochondromas. GeneReviews PubMed Book. September 5, 2008.

Schmale GA, Conrad EU, Raskind WH: The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg [Am]* 1994, 76(7):986-992.

Senay C, Lind T, Muguruma K, Tone Y, Kitagawa H, Sugahara K, Lidholt K, Lindahl U, Kusche-Gullberg M (2000) The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Reports* 1:282–286.

Simmons AD, Musy MM, Lopes CS, Hwang L-Y, Yang Y-P, Lovett M. A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferases is defective in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:2155–2164.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;**273**:613–622.

Wells DE, Hill A, Lin X, Ahn J, Brown N, Wagner MJ. Identification of novel mutations in the human EXT1 tumor suppressor gene. *Hum Genet* 1997;**99**:612-615.

White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, Breuning MH, den Dunnen JT. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat.* 2004; 24: 86–92.

Wicklund LC, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT: Natural history study of hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet* 1995, 55:43-46.

Wuyts W, Radersma R, Storm K, Vits L. An optimized DHPLC protocol for molecular testing of the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple osteochondromas. *Clin Genet.* 2005; 68: 542–7.

Wuyts W, Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Hum Mutat.* 2000; 15: 220–7.

Wuyts W, Van Hul W, De Boulle K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Ludecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ. Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 346–54.

Wuyts W, Van Hul W, Hendrickx J, Speleman F, Wauters J, De Boulle K, Van Roy N, Van Agtmael T, Bossuyt P, Willems PJ (1997) Identification and characterization of a novel member of the EXT gene family, EXTL2. *Eur J Hum Genet* 5:382–389.

Wuyts W, Van Hul W, Wauters J, Nemtsova M, Reyniers E, Van Hul EV, De Boulle K, de Vries BB, Hendrickx J, Her rygers I, Bossuyt P, Balemans W, Fransen E, Vits L, Coucke P, Nowak NJ, Shows TB, Mallet L, van den Ouweland AM, McGaughran J, Halley DJ, Willems PJ (1996) Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet* 5:1547–1557.

Xu L, Xia J, Jiang H, Zhou J, Li H, Wang D, Pan Q, Long Z, Fan C, Deng HX (1999) Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese. *Hum Genet* 105:45–50.

Zak BM, Crawford BE, Esko JD. Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim Biophys Acta* 2002;1573:346–355.

Páginas electrónicas:

www.OMIM.com

www.GenReviews.com

<http://medgen.ua.ac.be/LOVD>

En esta página electrónica se encuentra una base de datos de mutaciones en Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria.

